

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/050479

International filing date: 04 February 2005 (04.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE

Number: 102004005885.7

Filing date: 05 February 2004 (05.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 19 May 2005 (19.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 005 885.7
Anmeldetag: 05. Februar 2004
Anmelder/Inhaber: RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN, 53113 Bonn/DE
Bezeichnung: Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter
Fehlpaarungs-Diskriminierung
IPC: C 12 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. April 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Faust".

Faust

040123de/JH/BM

Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allel-spezifische PCR geeignet.

Hintergrund der Erfindung

Seit der Vorstellung der ersten menschlichen Genomsequenzen konzentriert sich die Forschung auf die Entdeckung genetischer Unterschiede zwischen den Individuen wie z.B. Einzelbasenmutationen ("single nucleotide polymorphisms" SNP's). Dies ist von Interesse, da zunehmend ersichtlich wird, dass Einzelbasenvariationen im Genom mit unterschiedlicher Arzneimittelverträglichkeit oder Prädisposition für verschiedenste Krankheiten verknüpft sind. In Zukunft könnte die Kenntnis medizinisch relevanter Nukleotidvariationen es ermöglichen, Therapien auf die individuelle genetische Ausstattung anzupassen und die Behandlung mit Medikamenten, die ineffektiv sind oder sogar zu Nebenwirkungen führen, könnte verhindert werden (Shi, Expert Rev. Mol. Diagn. 1, 363-365 (2001)). Es ist offensichtlich, dass Entwicklungen, die eine zeit- und kosten-effiziente Identifizierung von Nukleotidvariationen ermöglichen, zu weiteren Fortschritten in der Pharmakogenetik führen.

SNPs machen den größten Teil der genetischen Variationen im menschlichen Genom aus, und sind die Ursache für über 90% der Unterschiede zwischen Individuen (Kwok, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet 2, 235-258 (2001); Kwok und Chen, Curr. Issues Mol. Biol. 5, 43-60 (2003); Twyman and Primrose, Pharmacogenomics 4, 67-79 (2003)). Zum Nachweis solcher genetischer Variationen und anderer Nukleinsäure-Varianten wie Mutationen können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. Beispielsweise kann die Identifikation der Variante einer Target-Nukleinsäure durch Hybridisation der zu analysierenden Nukleinsäure-Probe mit einer Sequenzvarianten-spezifischen Hybridisationssonde unter geeigneten Hybridisationsbedingungen erfolgen (Guo et al., Nat. Biotechnol. 15, 331-335 (1997)).

Es hat sich jedoch herausgestellt, dass derartige Hybridisierungsmethoden, insbesondere den klinischen Anforderungen hinsichtlich der erforderlichen Sensitivität derartiger Assays, nicht genügen. Deshalb hat zum Nachweis von Mutationen, Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) sowie anderen allelischen Sequenzvarianten insbesondere auch die PCR (Saiki et al., Science 239, 487-490 (1988)) breiten Eingang in molekular-biologische und diagnostische Untersuchungsverfahren gefunden, wobei eine im Hinblick auf die Existenz einer Variante zu untersuchende Target-Nukleinsäure durch eine Polymerase-Kettenreaktion vor der Hybridisierung amplifiziert wird. Als Hybridisationssonden für derartige Assays werden in der Regel einzelsträngige Oligonukleotide verwendet. Eine abgewandelte Ausführungsform dieser Assays sind solche, die fluoreszierende Hybridisationssonden einsetzen (Livak, Genet Anal. 14, 143-149 (1999)). Generell wird angestrebt Verfahren zur Bestimmung SNPs und andern Sequenzvariationen zu automatisieren (Gut, Hum. Mutat. 17, 475-492 (2001)).

Eine bereits im Stand der Technik bekannte Alternative zur Sequenzvariantenspezifischen Hybridisierung bietet die sogenannte Allel-spezifische Amplifikation (Newton et al., Nucleic Acids Res. 17, 2503-2516 (1989); Germer et al., genome res. 10, 258-266 (2000); Gibbs et al., Nucleic Acids Res. 17, 2437-2448 (1989); Wu et al., PNAS 86, 2757-2769 (1989); Ishikawa et al., Hum. Immunol. 42, 315-318 (1995)). Bei diesem Nachweisverfahren werden bereits während der Amplifikation Varianten-spezifische Amplifikationsprimer eingesetzt, die in der Regel am 3' terminalen Ende des Primers einen sog. diskriminierenden terminalen Nukleotidrest besitzen, welcher lediglich komplementär zu nur einer speziellen Variante der nachzuweisenden Target-Nukleinsäure ist. Bei dieser Methode werden Nukleotidvariationen durch die An- oder Abwesenheit von DNA Produkt nach der PCR Amplifikation bestimmt. Das Prinzip der Allel-spezifische Amplifikation basiert auf der Ausbildung von kanonischen oder nicht kanonischen Primer-Template Komplexen am Ende von allel-spezifischen Primersonden. An einem korrekt gepaarten 3'-Primerende kann die Amplifikation durch eine DNA-Polymerase stattfinden, bei einem fehlgepaarten Primerende hingegen sollte die Verlängerung gehemmt sein.

US 5,595,890 beschreibt beispielsweise derartige Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation sowie deren Anwendung zum Nachweis von klinisch relevanten Punktmutationen, beispielsweise im k-ras-Onkogen. US 5,521,301 beschreibt ebenfalls Verfahren zu Allel-spezifischen Amplifikation zur Genotypisierung des

ABO-Blutgruppensystems. US 5,639,611 offenbart dagegen die Verwendung Allel-spezifischer Amplifikation im Zusammenhang mit dem Nachweis der für Sichelzell-Anämie verantwortlichen Punktmutation.

Die Allel-spezifische Amplifikation ist jedoch insofern problematisch, das sie sich durch eine nur geringe Selektivität aufzeichnet, wodurch weitere, aufwendige und damit zeit- und kostenintensive Optimierungsschritte bedingt werden.

Derartige Verfahren zum Nachweis von Sequenzvarianten, Polymorphismen und vor allem Punktmutationen erfordern insbesondere dann eine Allel-spezifische Amplifikation, wenn sich die nachzuweisende Sequenzvariante im Unterschuss verglichen mit einer im Überschuss vorhandenen Variante desselben Nukleinsäureabschnitts (bzw. desselben Gens) befindet.

Eine derartige Situation ist beispielsweise dann gegeben, wenn mit Hilfe von Allel-spezifischer Amplifikation disseminierte Tumorzellen in Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma nachgewiesen werden soll (US 5,496,699). Zu diesem Zweck wird zunächst DNA aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum oder Plasma isoliert, welche sich aus einem Unterschuss DNA an disseminierten Tumorzellen sowie einem Überschuss an DNA aus nicht proliferierenden Zellen zusammensetzt. Die für die tumorale DNA signifikanten Mutationen im k-Ras Gen müssen somit aufgrund von wenigen Kopien tumoraler DNA in Gegenwart eines Überschusses an Wildtyp DNA nachgewiesen werden.

Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Allel-spezifischen Amplifikation haben den Nachteil, dass trotz der Verwendung von 3' diskriminierenden Nukleotidresten eine Primerextension in Gegenwart einer geeigneten DNA Polymerase in geringerem Umfang auch dann erfolgt, wenn die Target-Nukleinsäure nicht exakt der nachzuweisenden Sequenzvariante entspricht, d. h., sich von dieser zumindest in dem zum diskriminierenden Nukleotidrest komplementären Nukleotid unterscheidet. Dies führt insbesondere dann zu falsch-positiven Ergebnissen, wenn eine bestimmte Sequenzvariante in einem Überschuß-Background von Nukleinsäuren enthaltend eine andere Sequenzvariante nachgewiesen werden soll. Dies ist wie oben erwähnt beispielsweise bei der Detektion von bestimmten k-Ras-Allelen als Indikator für disseminierte Tumorzellen der Fall. Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren besteht darin, daß in jedem Falle ein 3' terminal diskriminierender Oligonukleotidrest verwendet werden muß. Maßgeblich für die Nachteile dieser auf PCR basierenden Verfahren ist die Unfähigkeit der in diesen Verfahren eingesetzten Polymerasen ausreichend zwischen Ba-

senfehlpaarungen zu diskriminieren. Bislang war es daher nicht möglich direkt durch PCR eine eindeutige Aussage über die An- bzw. Abwesenheit einer Mutation zu machen. Es bedarf bislang immer weiterer zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren für eine eindeutige Diagnose solcher Mutationen. Daher werden Neuerungen, die eine Erhöhung der Selektivität der Allel-spezifischen PCR Amplifikation ermöglichen, einen signifikanten Einfluss auf Verlässlichkeit und Robustheit der direkten SNP-Analyse durch die PCR.

Andererseits werden bereits eine Reihe von Modifikationen in der Proteinsequenz der DNA-Polymerasen I beschrieben. So erwähnt das US-Patent 6,329,178 DNA-Polymerasemutanten mit geänderter katalytischer Aktivität, bei denen Mutationen in dem A-Motiv (der hochkonservierten Sequenz DYSQIELR) erfolgt waren. Darüber hinaus beschreibt Minnick, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 3067 – 3075 (1999) eine Vielzahl von *E.-coli*-DNA-Polymerase-I-(Klenow-Fragment)-Mutanten, bei denen Alaninaustausche vorgenommen wurde. Ein Teil der beschriebenen Mutanten zeigt eine höhere Polymerase-Genauigkeit, bezogen auf den Wildtyp. Eine der erwähnten Mutanten ist H881A; besondere Eigenschaften dieser Mutanten in Bezug auf die anderen beschriebenen Mutanten werden nicht aufgeführt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, Sequenzvarianten mit erhöhter Spezifität bereitzustellen, mit deren Hilfe ein Sequenzvarianten-spezifisches Nachweisverfahren ermöglicht wird.

Kurzbeschreibung der Erfindung

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass spezielle Mutanten von DNA-Polymerasen der Familie A, nämlich solche, in denen das konservierte C-Motiv und insbesondere dessen QHV-Aminosäuresequenz modifiziert wurde, eine erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweisen, und in Nachweisverfahren für Sequenzvarianten einsetzbar sind. Die thermostabilen Varianten hiervon sind zur allel-spezifischen PCR geeignet. Die vorliegende Erfindung betrifft im Einzelnen (1) eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlerpaarungs-Diskriminierung aufweist, oder ein Klenow-Fragment derselben;

- (2) eine DNA-Sequenz die die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß Ausführungsform (1) codiert;
- (3) ein Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Ausführungsform (2) enthält;
- (4) eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Ausführungsform (3) transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Ausführungsform (2) aufweist;
- (5) ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß der Ausführungsform (1), umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle Ausführungsform (4) und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand;
- (6) die Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß Ausführungsform (1) in diagnostischen und molekularbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.;
- (7) ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe unter Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß der Ausführungsform (1); und
- (8) ein Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß des Verfahrens nach Ausführungsform (7) enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1).

Kurzbeschreibung der Figuren

Figur 1: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (SEQ ID NO: 2) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex (Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TX-3', X= A, G, C oder T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG CYA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y= A, G, C oder T (SEQ ID NO:12), 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100).

Figur 2: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, 5'→3'-

Exonuklease-defizient) in Positionen 879-881 (bezogen auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment aus *E. coli*) auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [a: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:14); Matrizen: 5'-GGT CTA GCT ACA GXG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:15); b: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CXT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1 mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 600 nM DNA-Polymerase. Inkubation bei 37°C für 10 min in Puffer (50mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100).

Figur 3: Autoradiogramme nach denaturierender PAGE zur Untersuchung des Einflusses von Mutationen in QVH - Motiv in Taq DNA-Polymerase I auf die Selektivität der Primerverlängerung. Reaktionen enthielten 150 nM Primer-/Matrizen-Komplex [a: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TX-3', X= T (SEQ ID NO:11); Matrize: 5'-GA TCC CTG GAC AGG CYA GGA ATA CAG GTA TTT TGT-3', Y = A oder G (SEQ ID NO:12); b: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13); Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GXG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3', X = A oder T (SEQ ID NO:14); c: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15); Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CXT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3', X = A oder G (SEQ ID NO:16)], 1mM jeweils dATP, dCTP, TTP, dGTP und 0.6 ng DNA-Polymerase. Inkubation bei 37 °C für 10 min in Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20).

Figur 4: Real-time PCR Experimente mit Taq (wt) (SEQ ID NO:4) und LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784). Die Experimente wurden mittels einem *iCycler (BIORAD)* System durchgeführt. Typische Reaktion in 20 µl enthielt: 40 pM der betreffenden Matrize in *Taq* DNA-Polymerase Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25°C), 16 mM Ammoniumsulfat, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20, 0.3 mM dNTPs) 0.5 µM der beiden Primer und 95 ng *Taq* DNA-Polymerase und eine 1/50.000 von *SybrGreen I* 10.000x-Lösung in DMSO (*Molecular Probes*). Die PCR wurde mit folgendem Programm Zyklen bei 95°C für 30 s, 55°C für 35 s und 72°C für 40 s. Reaktionen 1w, 2w, 3w und 4w wurden mit dem

Wildtyp-Enzym, 1m, 2m, 3m und 4m mit der LVL-Mutante durchgeführt. DNA-Sequenzen:

a: Primersonde: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19); Reverse Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20); Matrize: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT CXC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A (wildtyp)(1) oder T (Mutante)(2) (SEQ ID NO:21).

b: Primersonde: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22); Reverse Primer: 5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23); Matrize: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA ACX TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A (wildtyp)(3) oder G (Mutante)(4) (SEQ ID NO:24).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind mutierte DNA-Polymerasen der Familie A mit erhöhter Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit, oder Klenow-Fragmente derselben. Die erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierungsfähigkeit - worunter eine hohe Selektivität gemäß der Watson-Crick-Regeln beim Einbau von komplementären Basen, wie auch schon der Anlagerung eines Primers an die Matrize zu verstehen ist, d. h. ein größeres Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$) als die entsprechende Ausgangspolymerase (Wildtyp) aufweist (z. B. bestimmt in dem Fluoreszenz-Testsystem gemäß Beispiel 2) - kann durch Mutation einer bestimmten Aminosäuresequenz in natürlichen Enzymen erreicht werden. Die dadurch bedingten Eigenschaften der DNA Polymerasen übertreffen die der "State-of-the-art" Wildtyppolymerasen, wie sie derzeit kommerziell vertrieben werden. Die Erhöhung der Selektivität der Aktivität von DNA-Polymerasen ermöglicht verlässlichere Systeme zum Nachweis von Mutationen oder Polymorphismen, die direkte Diagnose durch allel-specifische PCR ohne nachge-

schaltete zeit- und kostenintensive Aufreinigungs- und Analyseverfahren und hohe Nachhaltigkeit, da keine chemischen modifizierten Primer verwendet werden müssen.

Nachfolgend Definitionen sind auf die gesamte Anmeldung anzuwenden, sind aber nicht limitierend zu verstehen. "DNA-Polymerasen der Familie A" (auch Polymerasen I genannt) sind solche DNA-polymerisierenden Enzyme, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweisen. Es zählen dazu auch die hier beschriebenen Enzyme, die Mutationen im C-Motiv aufweisen. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen, sowie deren Mutanten.

Unter dem Begriff "Klenow-Fragment" wird ein jedes C-terminale Fragment einer DNA Polymerase der Familie A verstanden, das sowohl Polymeraseaktivität wie auch 3'→5' Exonukleaseaktivität (aber keine 5'→3' Exonukleaseaktivität) besitzt.

Unter "Vektoren" im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Plasmide, Cosmide, Phagemide, und Viren zu verstehen, die neben einer DNA von Interesse (wobei es sich insbesondere um erfindungsgemäße Sequenzen von DNA Polymerasen aus der Familie A handelt) auch Kontrollelemente, die die Expression der DNA von Interesse steuern, umfassen.

Unter den Begriff "Wirtszellen" fallen sowohl prokaryontische Zellen, wie *E. coli* (insbesondere *E. coli* XI1-blue, DH5 α , BI21 (DE3), M15 [pREP4], SG13005 [pREP4], BL21 (DE3) pLysS), *Halomonas elongata*, *Caulobacter sp.*, *Halobacterium halobium* usw., als auch eukaryontische Zellen, wie Hefe- und andere Pilz-zellen, pflanzliche und tierische Zellen, einschließlich isolierter menschlicher Zel-len, die sich in Zellkultur befinden. Des Weiteren werden unter dem Begriff „Wirtszelle“ auch Zellextrakte verstanden, die bei Vorlage einer mRNA diese translatieren können, wie Weizenkeimextrakt (wheat germ extract) als auch Kaninchen Reticulocytenextract (Rabbit reticulocyte extract, (RRL)). Weiterhin werden hier auch *in vitro* Expressionssystem als „Wirtszelle“ verstanden, wie z. B. das T7 Expression System, pBAD Expression System, ThioFusion™ Expression Systems, trc Expression System, PL Expression System, PurePro™ Caulobacter Expression System, Microbiological Media and Media Components, Qiagen pQE Expression System und das Novagen pET Expression System usw.

Ausführungsform (1) der Erfindung betrifft DNA-Polymerasen der Familie A oder deren Klenow-Fragment, die sich von natürlich vorkommenden DNA-Polymerasen dadurch unterscheiden, dass sie eine erhöhte Fehlpaarungsdiskriminierung auf-

weisen, was zu einer erhöhten Selektivität der Enzymaktivität führt. Die erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen leiten sich von bakteriellen DNA-Polymerasen, wie Polymerasen von *E. coli*, *Aquifex*, *Borielia*, *bacillus*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *chloroflexus*, *Haemophilis*, *Helio bacter*, *Lacococcus*, *Methylobakterium*, *Myocobakterium*, *Rohodothermus*, *Rickettsia*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Synecchocysts*, *Treponema* usw., insbesondere jedoch auch von Polymerasen thermostabiler Organismen wie *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis*, *Bacillus stearothermophilus* usw. ab. Bei den erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen oder deren Klenow-Fragmente sind dabei insbesondere in der Motiv-C-Sequenz QVH in Positionen 879 – 881 (in Bezug auf das in SEQ ID NO:2 gezeigte Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aus *E. coli*) wenigstens ein Aminosäurerest, vorzugsweise das Q und/oder das H, durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt.

"Lipophile Aminosäurereste" im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen die Aminosäurereste Gly, Ala, Val, Leu, Met, Phe, Trp, Ile, Pro usw. Bevorzugte Reste sind dabei Gly, Ala, Val, Leu und Ile. Im Sinne der vorliegenden Erfindung ist die Motiv-C-Sequenz QVH vorzugsweise durch die Sequenzen LVL, LVG, QVL, PIL, QVV, LVA, LAA, LVV, LVI, IVI, III, VVV, QVV, QVA usw. ersetzt, wobei ein Austausch durch LVL und LVG besonders bevorzugt ist.

Neben dem vorstehend genannten Austausch kann die erfindungsgemäße Polymerase noch weitere Mutationen wie z. B. Deletionen, Substitutionen und/oder Additionen (jeweils bis zu 20 Aminosäureresten) aufweisen, vorausgesetzt dass dadurch das größere Verlängerungsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$), bezogen auf den Wildtyp, nicht beeinträchtigt wird. Zu den Substitutionen zählen dabei insbesondere weitere (vorzugsweise konservative) Austausche in der Motiv-C-Sequenz, die neben dem oben aufgeführten Ersetzen wenigstens eines Restes in QVH durch einen lipophilen Aminosäurerest erfolgen. So umfasst die vorliegende Erfindung insbesondere auch solche DNA-Polymerasen, die eine Aminosäuresequenz LVN, LYH, PLQ, LVQ, QDL, QEL, QUV usw. an der Stelle von QVH im C-Motiv enthalten.

Darüber hinaus wurde gefunden, dass auch eine DNA-Polymerase mit der Sequenz QVN anstelle von QVH im C-Motiv ein größeres Verlängerungsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$), bezogen auf den Wildtyp, aufweist.

Weiterhin beinhaltet die Erfindung eine Taq-Polymerase deren QVH Sequenz wie vorstehend beschrieben ausgetauscht wurde. Besonders bevorzugt sind dabei solche Taq-Polymerase deren QVH Sequenz durch LVL oder LVG ausgetauscht wurden (in Bezug auf die in SEQ ID NO:4 gezeigte Taq Polymerase Proteinsequenz sind die Positionen 782-784 vom Austausch betroffen).

Bei den erfindungsgemäßen Klenow-Fragmenten ist es bevorzugt, dass wenigstens zwei Aminosäurereste in QVH durch lipophile Aminosäurereste ersetzt sind. Besonders bevorzugt unter den vorstehend genannten Sequenzen mit zwei Austauschen sind – auch für die Klenow-Fragmente - LVL und LVG.

Die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen wurde somit an einer oder mehreren Stellen verändert im Vergleich zu den DNA-Wildtyppolymerasen, und dies spiegelt sich auch auf Nukleinsäureebene wieder. Erfindungsgegenstand ist auch eine DNA Sequenz, die für eine der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen oder deren Klenow-Fragment codiert (Ausführungsform (2) der Erfindung). Ebenso ist ein Vektor, der die DNA-Polymerase (1) codierende DNA Sequenz enthält, sowie eine Wirtszelle, die mit einem Vektor transformiert ist, der die DNA-Polymerase (1) codierende DNA Sequenz enthält, und/oder die eine die DNA-Polymerase (1) codierende DNA aufweist, Gegenstand der Erfindung. Ebenfalls Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment, welches das Kultivieren der transformierten Wirtszelle und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand umfasst.

Thermostabile DNA-Polymerasen gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung haben eine höhere Selektivität in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und diskriminieren besser zwischen einzelnen Fehlpaarungen und kanonischen Komplexen als natürlich vorkommende DNA-Polymerasen. Dies bedingt verbesserte Eigenschaften der Mutanten im Einsatz von diagnostischen (Allel-spezifische PCR) und molekularbiologischen (DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung) Verfahren. Verfahren in denen die erfindungsgemäße DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment eingesetzt werden kann, sind daher ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die DNA-Polymerase gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung ist auch in einem Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von Sequenzvarianten in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe einsetzbar (Ausführungsform (7)). Solch ein Verfahren umfasst vorzugsweise einen oder mehrere der folgenden Schritte:

- a) Zugabe von
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
 - einer der erfindungsgemäßen DNA-Polymerasen
 - mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuweisende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proximalen-, oder 3' proxim-proximalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,
 - mindestens einem weiteren Primer, der komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers ist
- b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält
- c) Trennung des Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template Nukleinsäure
- d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion
- e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.

In diesem Zusammenhang sind die für die Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Begriffe wie folgt zu verstehen:

Eine "erfindungsgemäße DNA Polymerase" ist dabei eine wie vorstehend definierte DNA-Polymerase der Familie A, die das A-Motiv mit der Sequenz DYSQIELR in ihrem aktiven Zentrum aufweist und bestimmte Mutationen im C-

Motiv besitzt. Insbesondere zählen zu diesen auch thermostabile DNA Polymerasen mit Mutationen im C-Motiv. Bei den Mutationen handelt es sich um konservative Substitutionen der QVL Aminosäurereste des C-Motivs und/oder die vorstehend definierten nicht-konservierende Substitutionen.

Eine "thermostabile DNA Polymerase" ist eine Polymerase die auch bei Temperaturen von über 42°C funktionsfähig ist, und insbesondere bei auf PCR basierenden Amplifikationsverfahren eingesetzt werden kann.

Insbesondere fallen unter dem Begriff „Extensionsreaktionen“ Reaktionsgemische die wenigstens eine Polymerase, Nukleotide, eine Matrize(n) und Primer umfassen. Die Reaktionsbedingungen sind so gewählt, dass der/die Primer sich an die Matrize anlagern kann/können, und die Polymerase die Verlängerung des/der Primers durch Einbau von matrizenkomplementären Nukleotiden katalisiert. Als Produkt entsteht ein Primerextensionsprodukt.

Eine "Target-Nukleinsäure" ist ein Nukleinsäure-Abschnitt aus einer biologischen Probe, deren Sequenz mit Hilfe des erfindungsgemäßigen Verfahrens näher analysiert werden soll. Die biologische Probe besteht dabei in der Regel aus genetischer DNA. Ebensogut ist das erfindungsgemäße Verfahren jedoch für die Analyse von RNA-Sequenzvarianten geeignet (?). Es ist dabei unerheblich, ob die Probe aus zellulärem Material oder biologischen Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin oder Speichel isoliert wurde.

Unter einer "Sequenzvariante" im Sinne der Erfindung ist eine Target-Nukleinsäure mit einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz zu verstehen, die sich von Sequenzen anderer möglicher Target Nukleinsäuren nur minimal unterscheidet, und bedingt durch diese minimalen Unterschiede identifizierbar ist. Dabei betreffen die Sequenzunterschiede vorzugsweise zwischen ein und drei aufeinander folgende Nukleotidreste. Besonders geeignet ist die vorliegende Erfindung zur Identifikation von Sequenzvarianten betreffend nur einem einzelnen Nukleotidrest (SNP). Dabei kann es sich sowohl um einen Basenaustausch, aber alternativ auch um Nukleotidadditionen bzw. -deletionen handeln. Auf diese Art können verschiedene Allele voneinander unterschieden werden. Punktmutationen oder Polymorphismen können so ebenfalls nachgewiesen werden. Unter einer Sequenzvariante werden somit insbesondere auch Punktmutationen oder Polymorphismen verstanden, die im Hinblick auf prognostische oder diagnostische Fragestellungen analysiert werden.

Bei einer Matrizen-abhängigen Polymerisation von Desoxynukleotid-triphosphaten erfolgt beginnend am 3'-Ende eines sogenannten Primers, welcher an eine einzelsträngige Template-Nukleinsäure hybridisiert ist, eine Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate in der Weise, dass eine zur Target-Nukleinsäure komplementäre Sequenz entsteht. Derartige Polymerisationsreaktionen in 5'-3'-Orientierung werden vorzugsweise enzymatisch mit sog. DNA-Polymerasen, wie beispielsweise Klenow Polymerase, durchgeführt. Besonders bevorzugt sind thermostabile DNA-Polymerasen, wie z.B. Taq-Polymerase (Roche Applied Science Katalog Nr. 1146165).

Ein "diskriminierender Primer" im Sinne der Erfindung ist ein Primer, dessen Sequenz exakt komplementär zu einer bestimmten Sequenzvariante ist, wobei diese Sequenz bestimmte Unterschiede zu einer anderen Sequenzvariante aufweist, welche sich in der zu analysierenden Probe befinden kann. Als "diskriminierender Nukleotidrest" wird in diesem Zusammenhang ein Nukleotidrest verstanden, dessen Komplément in den verschiedenen existierenden Sequenzvarianten von unterschiedlichen Nukleotidresten gebildet wird.

Der "3'-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest, der sich an dem terminalen Ende eines Oligonukleotidprimers befindet, das eine freie 3'-OH-Gruppe besitzt. Der "proxy-terminale Nukleotidrest" ist derjenige Nukleotidrest eines Oligonukleotidprimers, dessen Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des terminalen Nukleotidrestes verbunden ist. Als proxy-proxy-terminaler Nukleotidrest wird derjenige Nukleotidrest bezeichnet, dessen 3'-Ende über eine Phosphatgruppe mit dem 5'-Ende des proxy-terminalen Nukleotidrests verknüpft ist.

Wie aus der oben stehenden Beschreibung des erfindungsgemäßen Verfahrens hervorgeht, handelt es sich bei den Schritten a)-e) im Wesentlichen um eine Amplifikationsreaktion, die abhängig von der An- oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenzreaktion zu einem Amplifikationsprodukt führt. Derartige Verfahren können deshalb nach aus dem Stand der Technik bekannten Protokollen für PCR-Reaktionen durchgeführt werden.

Gegenstand der Erfindung ist in diesem Zusammenhang auch ein Kit, enthaltend Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Ein derartiger Kit enthält insbesondere eine erfindungsgemäße DNA-Polymerase. Wahlweise kann ein derartiger Kit zusätzliche Komponenten enthalten wie beispielsweise einen

oder mehrere (diskriminierende) Primer, Desoxynukleotidtriphosphat, Puffer, Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der kleinen Furche anbindendende Reagenzien, wobei besonders bevorzugt Reagenzien aus der Gruppe von PicoGreen (Molecular Probes), SybrGreen (Molecular Probes), Ethidiumbromid, Gelstar (Cambrex), Vista Green (Amesham) ausgewählt werden, Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock, sowie Mittel zur Template-abhängigen Polymerisation der Desoxynukleotidtriphosphate. Die einzelnen Komponenten des Kits können in verschiedenen Ausführungsformen wahlweise in einem Aufbewahrungsgefäß zusammen bzw. in zwei oder mehreren Aufbewahrungsgefäßen getrennt enthalten sein.

Wie aus den weiter unten aufgeführten Beispielen hervorgeht, sind die beobachteten Effekte hinsichtlich der Verbesserung der Spezifität gegenüber aus dem Stand der Technik verfügbaren Verfahren quantitativ eindeutig belegbar und führen dazu, dass unter PCR-Amplifikationsbedingungen Extensionsprodukte von Sequenzvarianten-spezifischen Primern in der Tat im Wesentlichen nur dann erhalten werden, wenn die zu analysierende Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält. Dieser spezifische Effekt kann durch Verbesserung und Optimierung der jeweiligen PCR-Parameter mit Hilfe von dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannten Maßnahmen optimiert und an die jeweils nachzuweisende Sequenzvariante adaptiert werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Hilfe von Real Time PCR. Bei dieser Methodik werden die Endprodukte der Amplifikationsreaktion nicht geelektrophoretisch nachgewiesen, sondern der Verlauf der Amplifikationsreaktion wird mit Hilfe von geeigneten Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden verfolgt, so dass kinetische Echtzeitmessungen und Quantifizierungen möglich sind.

Bei den für die erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzenden Hybridisationssonden handelt es sich in der Regel um einzelsträngige Nukleinsäuren wie einzelsträngige DNA oder RNA bzw. deren Derivate oder alternativ auch PNAs, die bei der Annealing Temperatur der Amplifikationsreaktion mit der Target-Nukleinsäure hybridisieren. Üblicherweise haben diese Oligonukleotide eine Länge von 20 bis 100 Nukleotiden.

Die Markierung kann abhängig vom genauen Detektionsformat an jeder beliebigen Ribose- oder Phosphatgruppe des Oligonukleotids eingeführt werden. Bevorzugt sind Markierungen am 5' und 3' Ende des Nukleinsäuremoleküls. Die Art der Markierung muß im Echtzeit-Modus der Amplifikationsreaktion detektierbar sein. Dies ist beispielsweise nicht nur mit Fluoreszenzmarkierungen möglich, sondern alternativ auch mithilfe von Markierungen, die nach dem Prinzip der NMR detektierbar sind.

Dabei sind viele verschiedene Testführungen möglich. Als besonders geeignet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung haben sich die folgenden drei Detektionsformate erwiesen:

1. FRET-Hybridisationssonden: Für dieses Testformat werden 2 einzelsträngige Hybridisationssonden gleichzeitig verwendet, die komplementär zu benachbarten Stellen desselben Strangs der amplifizierten Target-Nukleinsäure sind. Beide Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzkomponenten markiert. Bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge einer ersten Komponente überträgt diese nach dem Prinzip des Fluoreszenzresonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, sodass bei Bindung beider Hybridisationsproben an benachbarte Positionen des nachzuweisenden Target-Moleküls eine Fluoreszenzemission der zweiten Komponente gemessen werden kann. Alternativ können ein Fluoreszenz-markierter Primer und nur eine markierte Oligonukleotidsonde verwendet werden (Bernard et al., Analytical Biochemistry 235, 1001-107 (1998)).

2. TaqMan-Hybridisationssonden: Eine einzelsträngige Hybridsidisationssonde wird mit 2 Komponenten markiert. Bei Anregung der ersten Komponente mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, den sogenannten Quencher übertragen. Während des Annealing-Schrittes der PCR Reaktion bindet die Hybridisationssonde an die Target-DNA und wird während der sich anschließenden Elongationsphase durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase degradiert. Dadurch werden die angeregte Fluoreszenzkomponente und der Quencher räumlich voneinander getrennt, sodass eine Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann.

3. Molecular Beacons: Diese Hybridisationssonden sind ebenfalls mit einer ersten Komponente und einem Quencher markiert, wobei sich die Markierungen vorzugsweise an den beiden Enden der Sonde befinden. In Lösung befinden sich beide Komponenten aufgrund der Sekundärstruktur der Sonde in räumlicher Nähe zueinander. Nach Hybridisierung an die Target-Nukleinsäure werden beide Komponenten von einander getrennt, sodass nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge die Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann (Lizardi et al., US 5,118,801).

In alternativen Ausführungsformen kann das jeweilige Amplifikationsprodukt erfundungsgemäß auch durch einen DNA-Bindefarbstoff nachgewiesen werden, welcher bei Interaktion mit doppelsträngiger Nukleinsäure nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge ein entsprechendes Fluoreszenzsignal emmitert.

Als besonders geeignet für diese Anwendung haben sich die Farbstoffe SybrGreen und SybrGold (Molecular Probes) erwiesen. Alternativ können auch interkalierende Farbstoffe verwendet werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und Abbildungen näher erläutert. Die beschriebenen Verfahren sind nicht als Einschränkung der Erfindung sondern als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beispiele

Beispiel 1: Aufbau einer Bibliothek und Reinigung von Klenow-Fragment-Varianten

Das Plasmid pQKF⁺ (Brakman, S., Nieckchen, P., ChemBioChem 2001, 2, 773-7; siehe auch das in SEQ ID NO:26 gezeigte äquivalente Plasmid pQE30) ermöglicht die Expression des N-terminalen 6-His-markierten Klenow-Fragments von *E.-coli*-DNA-Polymerase I (3'-5' exo⁻) unter der Kontrolle einer T5-Promotor/Doppel-lac-Operator-Sequenz. Die Einführung von Mutationen in die Motiv-c-Sequenz, die für Q879, V880 and H881 codiert, erfolgte durch eine zweistufige Megaprimer-Mutagenese. PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von PfuTurbo-DNA-Polymerase (Stratagene) und unter Standardbedingungen durchgeführt. Die erste PCR wurde mit einer dotierten Primerbibliothek durchgeführt (5'-GTA CGT ATG ATC ATG NNN NNN GAT GAA CTG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:5), die so aufgebaut war, dass sie 40% Nichtwildtyp-Nucleotid auf jeder der neun Zielpositionen und einen 23mer-Downstream-Primer (5'-GCT AAT TAA GCT TGG CTG

CAG GC-3'; SEQ ID NO:6) enthielt, was ein 195mer-PCR-Produkt ergab. Die zweite PCR wurde unter Verwendung des Agarose-Gel-gereinigten 195mers und eines 24mer-Antisense-Primers (5'-TAC ATG GAC CTT TAC TTC GAA CGC-3' SEQ ID NO:7) durchgeführt und ergab ein 457-bp-Produkt, das mit Csp45I und HindIII verdaut und in pQKF einkloniert wurde. Die resultierende Plasmidbibliothek wurde in *E.-coli*-XL-1blue (Stratagene) transformiert, Klone wurden aus Agarplatten herausgesucht und getrennt über Nacht in 96-Napf-Platten gezüchtet, die Superbroth-Medium (100 µg/ml Ampicillin) enthielten. Klenow-Fragment-Varianten wurden parallel in 600-µl-Kulturen exprimiert, geerntet und lysiert, wobei man 96-Napf-Platten verwendete, wie es beschrieben ist. Die erhaltenen 300-µl-Lysate wurden mit 900 µl Aufbewahrungspuffer (50mM Tris-HCl pH 7.3, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Aprotinin) verdünnt, zentrifugiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Für Primerverlängerungsreaktionen und kinetische Messungen im stationären Zustand wurden Klenow-Fragment und ausgesuchte Mutanten exprimiert, wie es oben beschrieben ist, und unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gereinigt, wobei die Vorschriften des Herstellers befolgt wurden, aber das Imidazol im Lyse- und Waschschritt weggelassen wurde. Die erhaltenen Enzyme waren >95% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Nach Austausch des Puffers (gegen 100 mM K₂HPO₄, 1 mM DTT pH 6.5 mit 50% Glycerin) wurden Konzentrationen unter Verwendung des Nanoorange-Assays (Molecular Probes) gemessen und auf 1 µg/µl eingestellt.

Beispiel 2: Durchmusterung (Screening)

Die Reaktionsgemische für die Durchmusterung der Bibliothek enthielten 150 nM Matrize, 225 nM Primer, 50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton X-100 und jeweils 200 µM dNTP. Die Reaktionen umfassten den 20mer-Primer FVL20TH (5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3'; SEQ ID NO:8), der so gestaltet ist, dass er mit der 3'-terminalen Base an das humane SNP G1691A bindet, das an der Faktor-V-Leiden-Mutation beteiligt ist. Für Messungen von Paarungsverlängerungseffizienzen wurde die 90mer-Matrize TFVL90A (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CAA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:9), die für das mutante Allel 1691A des humanen Faktor-V-ORF codiert, verwendet, was zu einem TA-Basenpaar am 3'-Terminus des Primers führte. Um Zugang zu Aktivitäten von Klenow-Varianten zu erhalten, die einen fehlgepaarten

Primerterminus prozessieren, wurde die 90mer-Matze TFVL90G (5'-GAC ATC ATG AGA GAC ATC GCC TCT GGG CTA ATA GGA CTA CTT CTA ATC TGT AAG AGC AGA TCC CTG GAC AGG CGA GGA ATA CAG GTA TTT-3'; SEQ ID NO:10) verwendet, die für das entsprechende Wildtyp-Allel 1691G codiert, was zu einer TG-Fehlpaarung am 3'-Primerterminus führte. Beide Reaktionen wurden für jedes Element der Bibliothek parallel durchgeführt, um eine Bewertung der Aktivitätsverhältnisse als Verlängerungsselektivitäten zu ermöglichen. 10 µl der Reaktionsgemische wurden in schwarze 384-Napf-Platten ausgegeben, die auf 37 °C vorgewärmt wurden, wobei man eine automatische Flüssigkeitshandhabungsvorrichtung (Hamilton Microlab Star) verwendete, und anschließend wurden 5 µl Ly satlösung hinzugefügt. Nach 10 min wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Stopplösung (50 mM Tris-HCl pH 7.3; 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) abgebrochen, die 3.4x SYBRGrün I (Molecular Probes) für die Quantifizierung der von Klenow-Varianten erzeugten dsDNA enthielt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzplatten-Lesegeräts (Polarstar Optima, BMG Labtechnologies GmbH) mit Anregung bei 485 nm und Emission bei 520 nm quantifiziert. Die Verhältnisse der gemessenen Fluoreszenzintensitäten ($F_{match}/F_{mismatch}$, willkürliche Einheiten) wurden zur Bestimmung der Verlängerungsselektivität herangezogen. Alle DNA-Polymerasen mit größerem Verlängerungsselektivitätsverhältnis ($F_{match}/F_{mismatch}$) als der Wildtyp wurden als Enzyme identifiziert, die eine erhöhte Verlängerungsselektivität besitzen.

Beispiel 3: Primerverlängerungsassays

Primer-Matrizensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.3, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.05% Triton® X-100) mit der doppelten Menge Matze mischte. Das Gemisch wurde 5 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Assays beinhalteten 150 nM Primer, 225 nM Matze, jeweils 1 mM dNTP und 590 nM Enzym in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid, EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% de-

naturierendes PAGE analysiert (siehe Fig. 1 und 2). Die folgenden Primer- und Matrizensequenzen wurden im Zusammenhang mit verschiedenen SNPs (Positionen unterstrichen) eingesetzt:

Humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz: Primer: 5'-ACA AAA TAC CTG TAT TCC TT-3' (SEQ ID NO:11), Wildtypmatrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC GAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12), mutante Matrize: 5'-GAT CCC TGG ACA GGC AAG GAA TAC AGG TAT TTT GT-3' (SEQ ID NO:12).

Humane somatische BRAF-T1796A-Mutation: Primer: 5'-GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T-3' (SEQ ID NO:13), Wildtypmatrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GTG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14), mutante Matrize: 5'-GGT CTA GCT ACA GAG AAA TCT CGA TGG AGT GGG TC-3' (SEQ ID NO:14).

Humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A: Primer: 5'-GTT TTA GAT GTT AAA TCA CAC TTA T-3' (SEQ ID NO:15), Wildtypmatrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CGT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16), mutante Matrize: 5'-CTT TCC AGA CAA CAT AAG TGT GAT TTA ACA TCT AAA AC-3' (SEQ ID NO:16).

Humane saure Ceramidase Mutation A107G: Primer: 5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG AT-3' (SEQ ID NO:17), Wildtypmatrize: 5'-AAA TCA ACC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18), mutante Matrize: 5'-AAA TCA ACC TGT CCT CCT TCA GGA CCA ACG TAC-3' (SEQ ID NO:18).

Beispiel 4: Klonieren von Taq-DNA-Polymerase

Das Plasmid pTTQ18::*Taq* (SEQ ID NO: 25) wurde von Engelke *et al.* (Anal. Biochem.1990, 191, 396-400 (1990)) konstruiert und ermöglicht die Expression von *Taq*-DNA-Polymerase unter der Kontrolle einer *Ptac*-Promotor/*lac*-Operator-Sequenz. Die LVL-Mutation wurde durch PCR in das *Taq*-QVH-Motiv eingeführt, wobei man den QuikChange®-Kit von *Stratagene* verwendete. Das resultierende mutante Plasmid und das Wildtypplasmid wurden in *E.-coli*-XL1-Blue (*Stratagene*) transformiert. Klone wurden herausgesucht und über Nacht in 20 ml Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) gezüchtet. Die Expression der *Taq*-Klone wurde in Kulturen in 1 l Superbroth (100 µg/ml Carbenicillin) durchgeführt, und die Zellen wurden nach 16 h Induktion mit 1 mM IPTG geerntet. Die Reinigung der *Taq*-DNA-Polymerase wurde so durchgeführt, wie es von Engelke *et. al* (Anal. Biochem.1990, 191, 396-400) beschrieben wird. Anstelle der Reinigung durch Ionenaustausch wurde eine Gelfiltration unter Verwendung einer Säule mit

Sephadex®-75 (Amersham) angewendet. Die erhaltenen Enzyme waren zu >90% rein, was durch SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung bestätigt wurde. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung des Nanoorange-Assays (Molecular Probes) und SDS PAGE mit Coomassie-Blau-Färbung gemessen.

Beispiel 5: Primerverlängerung mit Katalyse durch Taq-DNA-Polymerase
Primer-Matrizensubstrate wurden assoziiert, indem man 5'-³²P-markierten Primer im spezifischen Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfat und 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween® 20) mit der doppelten Menge Matrize mischte. Das Gemisch wurde 10 min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend über 1 h auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Nach der Assoziation wurden dNTP hinzugefügt, und die Lösung wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. 15 µl Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 µl Enzymlösung in 1x Reaktionspuffer zu 10 µl Assoziationsmischung eingeleitet, und es wurde 10 min lang bei 72 °C inkubiert. Die Assays beinhalteten 150 nM Primer, 225 nM Matrize, jeweils 1 mM dNTP und 0,5 ng Taq-LVL-DNA-Polymerase (mutante Polymerase) und 0.06 ng Taq-DNA-Polymerase in geeignetem Reaktionspuffer. Nach 10 min Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 30 µl Gelbeladungspuffer (80% Formamid, EDTA, 20 mM) abgebrochen, und die Produktgemische wurden durch 14% denaturierendes PAGE analysiert (siehe Figur 3). Bezuglich der Primer- und Matrizensequenzen, die im Zusammenhang mit den SNPs humane genomische Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz, humane somatische BRAF-T1796A-Mutation und humane Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation G735A verwendet wurden, wird auf Beispiel 3 verwiesen.

Beispiel 6: Echtzeit-PCR-Experimente

Echtzeit-PCR wurde unter Verwendung eines iCycler-Systems (BIORAD) durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt, das 4 pM der jeweiligen Matrizen in Taq-DNA-Polymerase-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 9.2 bei 25 °C), 16 mM Ammoniumsulfat und 2.5 mM MgCl₂, 0.1 % Tween 20) enthielt. Die endgültigen Gemische enthielten dNTPs (jeweils 200 µM dATP, dGTP, dCTP und TTP), Primer (jeweils 0.5 µM der jeweiligen Primersonde und des umgekehrten Primers) und 13 ng Taq-DNA-Polymerase (SEQ ID NO:4), 95 ng DNA-Polymerase von Taq-LVL-Mutante (SEQ ID NO:4 mit LVL in Positionen 782 – 784) und eine wässrige 1/50.000-Verdünnung einer 10.000fachen Lösung

von *SybrGreen I* in DMSO (*Molecular Probes*). Alle PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt: Anfangsdenaturierung bei 95 °C während 3 min, dann 40 Cyclen Denaturierung bei 95 °C während 30 s, Primerassoziation bei 55 °C während 35 s und Verlängerung bei 72 °C während 40 s. Die vorgestellten Ergebnisse stammen von wenigstens dreimal wiederholten unabhängigen Messungen an drei Parallelansätzen, die aus einer Stammmischung hervorgingen. Die Ergebnisse sind in Figur 4 zusammengefasst.

Die folgenden DNA-Sequenzen wurden eingesetzt:

Sequenzen im BRAF-Zusammenhang: Primersonde BrafT: 5'-d(GAC CCA CTC CAT CGA GAT TTC T) (SEQ ID NO:19), umgekehrter Primer: 5'-d(AGA GGA AAG ATG AAG TAC TAT G) (SEQ ID NO:20), Zielmatrize BrafX: 5'-d(CAA CTG TTC AAA CTG ATG GGA CCC ACT CCA TCG AGA TTT C_XC TGT AGC TAG ACC AAA ATC ACC TAT TTT TAC TGT GAG GTC TTC ATG AAG AAA TAT ATC TGA GGT GTA GTA AGT AAA GGA AAA CAG TAG ATC TCA TTT TCC TAT CAG AGC AAG CAT TAT GAA GAG TTT AGG TAA GAG ATC TAA TTT CTA TAA TTC TGT AAT ATA ATA TTC TTT AAA ACA TAG TAC TTC ATC TTT CCT CT), X= A BrafA, X= T, BrafT (SEQ ID NO:21).

Sequenzen im DPyD-Zusammenhang: Primersonde DpyDT: 5'-d(GTT TTA GAT GT TAA ATC ACA CTT AT) (SEQ ID NO:22), umgekehrter Primer: (5'-d(AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AG) (SEQ ID NO:23), Zielmatrize DPyDX: 5'-d(AAA ATG TGA GAA GGG ACC TCA TAA AAT ATG TCA TAT GGA AAT GAG CAG ATA ATA AAG ATT ATA GCT TTT CTT TGT CAA AAG GAG ACT CAA TAT CTT TAC TCT TTC ATC AGG ACA TTG TGA CAA ATG TTT CCC CCA GAA TCA TCC GGG GAA CCA CCT CTG GCC CCA TGT ATG GCC CTG GAC AAA GCT CCT TTC TGA ATA TTG AGC TCA TCA GTG AGA AAA CGG CTG CAT ATT GGT GTC AAA GTG TCA CTG AAC TAA AGG CTG ACT TTC CAG ACA AC_X TAA GTG TGA TTT AAC ATC TAA AAC), X= A DpyDA, X= T, DpyDG (SEQ ID NO:24). Die Oligonucleotide BrafX und DpyDX (SEQ ID NO:21 und 24) wurden von IBA, Göttingen, synthetisiert und gereinigt.

Patentansprüche

1. Eine DNA-Polymerase der Familie A, die eine modifizierte Motiv-C-Sequenz und eine, im Vergleich zu der entsprechenden Wildtyppolymerase, erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweist oder ein Klenow-Fragment derselben.
2. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1, die eine bakterielle DNA-Polymerase, vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase ist, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe von Polymerasen von *Thermus thermophilus*, *Thermus filiformis*, *Rhodothermus obamensis* oder *Bacillus stearothermophilus*.
3. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, wobei in der Motiv-c-Sequenz QVH in Position 879-881, bezogen auf das in SEQ ID NO: 2 gezeigte Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase, wenigstens ein Aminosäurerest, vorzugsweise Q879 und/oder H881 durch einen lipophilen Aminosäurerest ersetzt wurde.
4. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 3, wobei der lipophile Aminosäurerest ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met und Trp, vorzugsweise ausgewählt ist aus Gly, Ala, Val, Leu und Ile und besonders bevorzugt die Motiv-C-Sequenz QVH ersetzt ist durch die Sequenzen LVL oder LVG.
5. Die DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment nach Anspruch 3,
 - (i) die eine Taq-Polymerase mit der in SEQ ID NO:4 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 782-784 durch LVL oder LVG ersetzt ist oder
 - (ii) die ein Klenow-Fragment mit der in SEQ ID NO:2 gezeigten Sequenz ist, in der die Sequenz QVH in Position 879-881 durch LVL oder LVG ersetzt ist.
6. Eine DNA-Sequenz die für eine DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 codiert.

7. Ein Vektor, der die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6 enthält.
8. Eine Wirtszelle, die mit dem Vektor gemäß Anspruch 7 transformiert ist und/oder eine DNA gemäß Anspruch 6 aufweist.
9. Ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Polymerase oder deren Klenow-Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 umfassend das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 8 und das Isolieren der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments aus der Kultur oder dem Kulturüberstand.
10. Verwendung der DNA-Polymerase oder des Klenow-Fragments gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 in diagnostischen und molekulärbiologischen Verfahren, einschließlich allel-spezifischer PCR, DNA-Amplifikation mittels PCR, Klonierung usw.
11. Ein Verfahren zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe, umfassend die Verwendung einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, enthaltend folgende Schritte:
 - a) Zugabe von
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten,
 - einer DNA-Polymerase gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5,
 - mindestens einem diskriminierenden Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei für jede nachzuweisende Sequenzvariante einer Target-Nukleinsäure ein Primer zugegeben wird, welcher eine Sequenz komplementär zur nachzuweisenden Sequenzvariante aufweist, und wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3' terminalen-, 3' proxi-terminalen-, oder 3' proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest des diskriminierenden Primers ist,

- mindestens einem weiteren Primer, der komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension eines diskriminierenden Primers ist;
- b) Durchführung einer Primer-Extensionsreaktion, wobei ein Verlängerungsprodukt des diskriminierenden Primers im Wesentlichen nur dann erhalten wird, wenn die Probe eine Target-Nukleinsäure mit der nachzuweisenden Sequenzvariante enthält;
- c) Trennung der Produkts der Primer-Extensionsreaktion von der Template Nukleinsäure;
- d) Zyklische Wiederholung der Schritte b) und c) zum Erhalt eines Amplifikationsproduktes, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion; und
- e) Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer Sequenzvariante aufgrund der An- oder Abwesenheit des Amplifikationsproduktes.
13. Das Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Schritte b) - e) als Real Time PCR oder Real Time RT-PCR durchgeführt werden.
14. Ein Kit zur Bestimmung der An- oder Abwesenheit von mindestens einer Sequenzvariante in einer oder mehreren Target-Nukleinsäuren in einer individuellen Probe gemäß Anspruch 11 bis 13, enthaltend wenigstens eine DNA-Polymerase gemäß Ansprüchen 1 bis 5.
15. Der Kit nach Anspruch 14, zusätzlich enthaltend einen oder mehrere der folgenden Komponenten
- einen oder mehrere diskriminierende Primer, enthaltend mindestens einen diskriminierenden Nukleotidrest, wobei die nachzuweisende Sequenzvariante in der Target-Nukleinsäure komplementär zu mindestens einem 3'-terminalen-, 3' proxi-terminalen-, oder 3' proxi-proxi-terminalen Nukleotidrest der diskriminierenden Primer ist,
 - einen oder mehrere weitere Primer, die komplementär zu einem Primer-Extensionsprodukt, entstehend durch Extension der diskriminierenden Primer sind,
 - Desoxy-Nukleosid-Triphosphate,
 - Puffer

- Quantifizierungsreagenzien, insbesondere interkalierende Reagenzien oder in der kleinen Furche anbindendende Reagenzien und
- Polymerase-blockierende Antikörper, insbesondere TaqBlock.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

<120> Mutierte DNA-Polymerasen mit erhöhter
Fehlpaarungs-Diskriminierung

<130> 040123de JH/BM

<140>

<141>

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2787

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: E. coli
Wildtyp Klenow Fragment der DNA Polymerase 1

<400> 1

atgttcaga tcccccaaaa tccacttata cttgttagatg gttcatctta tctttatcg 60
 gcatatcacg cgtttcccccc gctgactaac agcgcaggcg agccgaccgg tgcgatgtat 120
 ggtgtccctca acatgctgctg cagtcgtatc atgcaatata aaccgacgca tgcagcgg 180
 gtctttgacg ccaaggaaaa aacctttcgat gatgaactgt ttgaacatata caaatcacat 240
 cgcccgccaa tgccggacgat tctgcgtgca caaatcgaac ctttgacacgc gatggtt 300
 gcatgggac tgccgtctgat ggcgtttctt ggcgttagaag cggacgacgt tatcggtact 360
 ctggcgcccg aagccgaaaa agccggccgt ccgggtctgat tcagcactgg cgataaagat 420
 atggcgccgc tggtgacgat aaatattacg cttatcaata ccatgacgaa taccatcc 480
 ggaccggaaag aggtggtaa taagtacggc gtgcggccag aactgatcat cgattcc 540
 gcgctgtatgg gtgactccctc tgataaacatt cctggcgatc cggcgctgg tgaaaaacc 600
 gcgaggcat tgctgcaagg tcttggcgat cttggatacgc tttatggccg gccaagaaaa 660
 attgctgggt tgagcttccg tggcgccaaa acaatggcag cgaagctcga gcaaaacaaa 720
 gaaatgtgtt atctctcata ccagctggcg acgataaaaa ccgaacgttga actggagctg 780
 acctgtgaac aactggaaatg gcagcaaccg gcagcggaaag agttgttgg gctgttcaaa 840
 aagtatgatg tcaaaccgtg gactgctgat gtcgaagcgg gcaaatggg acaggccaaa 900
 ggggcaaaac cagccgcgaa gccacaggaa accagtgttgcagacgaaaccgaaatgg 960
 acggcaacgg tgatttttta tgacaactac gtcaccatcc ttgtatgaa aacactgaaa 1020
 gctgtggatttgc gcaagctggaa aaaaacggccg gtatttgcatt ttgataccga aaccgacagc 1080
 cttgataaca tctctgtttaa cctggcgat ctttcttttgc tttatcgatcc agggcgatcg 1140
 gcatatatcc cgggtgtctca tgatttatctt gatgcggcccg atcaatctc tcgcgagcgt 1200
 gcactcgatgt tgctaaaacc gctgtggaa gatgaaaagg cgctgaaggat cgggcaaaac 1260
 ctgaaatacgt atcgcggat tctggcgaaatc tacggcatttgc aactgcgtgg gattgcgtt 1320
 gataccatgc tggagtccata catttcataat agcgttgcgg ggcgtcacga tatggacagc 1380
 ctcgcggaaatc gttgggttggaa gcacaaaacc atcacttttgc aagagatgtc tggtaaaggc 1440
 aaaaatcaac tgaccatccaa ccagattgcc ctcgaagaag cccgacgttgc cggccggaa 1500
 gatgcagatgt tcacccgtca gttgcatttgc aaaaatgtggc cgatctgca aaaacacaaa 1560
 gggccgttgc acgttccgtca gaatatcgaa atgcccgtgg tggcggtgttgc ttcacgcatt 1620
 gaacgtaacg gtgtgaagat cgatccgaaa gtcgtgcaca atcattctgat agagctcacc 1680
 cttcgtctgg ctgagctggaa aaagaaaagcg catgaaatttgc caggtgagga atttaacctt 1740
 tcttccacca agcagttaca aaccatttgc tttgaaaaac agggcattaa accgcgttgc 1800
 aaaacgcgggttgc gttggcgccgc gtcaacgtcg gaagaggtac tggaaagaact ggcgttgc 1860
 tatccgttgc caaaaatgtat tctggatgtat cgtggcttgc cgaagctgaa atcgcaccc 1920

accgacaaga tgccgtctgat gatcaacccg aaaaccgggc gtgtgcatac ctcttatcac 1980
 caggcagtaa ctgcaacggg acgttatacg tcaaccgatc ctaaacctgca aaacattccg 2040
 gtgcgtaaacg aagaaggctcg tcgtatccgc caggcgttta ttgcgccaga ggattatgtg 2100
 atttgtcttag cgactactc gcagatggaa ctgcgcattt tggcgcattt ttcgcgtgac 2160
 aaaggcttgc tgaccgcattt cgcggaaagga aaagatatacc accgggcaac ggcggcagaa 2220
 gtgtttggtt tgccactgga aaccgtcacc agcgagcaac gccgtagcgc gaaagcgatc 2280
 aactttggtc tgatttatgg catgagtgtt ttccgtctgg cgcgcattt gaacattcca 2340
 cgtaaagaag cgagaagta catggacattt tacttcgaac gctaccctgg cgtgctggag 2400
 tatatggAAC gcaccctgtc tcaggcgaaa gagcagggtt acgttgaac gctggacgga 2460
 cggcgtctgt atctgcggat tatcaaattcc agcaatggtg ctgcgtgac agcggctgaa 2520
 cgtgcagccat ttaacgcggc aatgcaggga accggccggcc acattatcaa acggggcatg 2580
 attggcggtt atgcgtgggtt acaggctgag caaccgcgtg tacgtatgtt catgcaggta 2640
 cacgatgaac tggtatttga agttcataaa gatgtatgtt atgcgtcgc gaagcagatt 2700
 catcaactga tggaaaactg taccgcgtctg gatgtgcgt tgctgggttga agtggggagt 2760
 ggcggaaaactt gggatcaggc gcactaa 2787

<210> 2.

<211> 928

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: E.coli Klenow Fragment der DNA Polymerase I

<400> 2

Tyr Leu Tyr Arg Ala Tyr His Ala Phe Pro Pro Leu Thr Asn Ser Ala
20 25 30

Gly Glu Pro Thr Gly Ala Met Tyr Gly Val Leu Asn Met Leu Arg Ser
35 40 45

Leu Ile Met Gin Tyr Lys Pro Thr His Ala Ala Val Val Phe Asp Ala
50 55 60

Lys Gly Lys Thr Phe Arg Asp Glu Leu Phe Glu His Tyr Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Pro Pro Met Pro Asp Asp Leu Arg Ala Gln Ile Glu Pro Leu His
85 90 95

Ala Met Val Lys Ala Met Gly Leu Pro Leu Leu Ala Val Ser Gly Val
100 . . . 105 . . . 110 . . .

Glu Ala Asp Asp Val Ile Gly Thr Leu Ala Arg Glu Ala Glu Lys Ala
115 120 125

Gly Arg Pro Val Leu Ile Ser Thr Gly Asp Lys Asp Met Ala Gln Leu
 130. 135 140

Val Thr Pro Asn Ile Thr Leu Ile Asn Thr Met Thr Asn Thr Ile Leu
145 150 155

Gly Pro Glu Glu Val Val Asn Lys Tyr Gly Val Pro Pro Glu Leu Ile

165

170

175

Ile Asp Phe Leu Ala Leu Met Gly Asp Ser Ser Asp Asn Ile Pro Gly
 180 185 190

Val Pro Gly Val Gly Glu Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Gln Gly Leu
 195 200 205

Gly Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Ala Glu Pro Glu Lys Ile Ala Gly Leu
 210 215 220

Ser Phe Arg Gly Ala Lys Thr Met Ala Ala Lys Leu Glu Gln Asn Lys
 225 230 235 240

Glu Val Ala Tyr Leu Ser Tyr Gln Leu Ala Thr Ile Lys Thr Asp Val
 245 250 255

Glu Leu Glu Leu Thr Cys Glu Gln Leu Glu Val Gln Gln Pro Ala Ala
 260 265 270

Glu Glu Leu Leu Gly Leu Phe Lys Lys Tyr Glu Phe Lys Arg Trp Thr
 275 280 285

Ala Asp Val Glu Ala Gly Lys Trp Leu Gln Ala Lys Gly Ala Lys Pro
 290 295 300

Ala Ala Lys Pro Gln Glu Thr Ser Val Ala Asp Glu Ala Pro Glu Val
 305 310 315 320

Thr Ala Thr Val Ile Ser Tyr Asp Asn Tyr Val Thr Ile Leu Asp Glu
 325 330 335

Glu Thr Leu Lys Ala Trp Ile Ala Lys Leu Glu Lys Ala Pro Val Phe
 340 345 350

Ala Phe Asp Thr Glu Thr Asp Ser Leu Asp Asn Ile Ser Ala Asn Leu
 355 360 365

Val Gly Leu Ser Phe Ala Ile Glu Pro Gly Val Ala Ala Tyr Ile Pro
 370 375 380

Val Ala His Asp Tyr Leu Asp Ala Pro Asp Gln Ile Ser Arg Glu Arg
 385 390 395 400

Ala Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Leu Glu Asp Glu Lys Ala Leu Lys
 405 410 415

Val Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Asp Arg Gly Ile Leu Ala Asn Tyr Gly
 420 425 430

Ile Glu Leu Arg Gly Ile Ala Phe Asp Thr Met Leu Glu Ser Tyr Ile
 435 440 445

Leu Asn Ser Val Ala Gly Arg His Asp Met Asp Ser Leu Ala Glu Arg
 450 455 460

Trp Leu Lys His Lys Thr Ile Thr Phe Glu Glu Ile Ala Gly Lys Gly
 465 470 475 480

Lys Asn Gln Leu Thr Phe Asn Gln Ile Ala Leu Glu Glu Ala Gly Arg
 485 490 495
 Tyr Ala Ala Glu Asp Ala Asp Val Thr Leu Gln Leu His Leu Lys Met
 500 505 510
 Trp Pro Asp Leu Gln Lys His Lys Gly Pro Leu Asn Val Phe Glu Asn
 515 520 525
 Ile Glu Met Pro Leu Val Pro Val Leu Ser Arg Ile Glu Arg Asn Gly
 530 535 540
 Val Lys Ile Asp Pro Lys Val Leu His Asn His Ser Glu Glu Leu Thr
 545 550 555 560
 Leu Arg Leu Ala Glu Leu Glu Lys Lys Ala His Glu Ile Ala Gly Glu
 565 570 575
 Glu Phe Asn Leu Ser Ser Thr Lys Gln Leu Gln Thr Ile Leu Phe Glu
 580 585 590
 Lys Gln Gly Ile Lys Pro Leu Lys Lys Thr Pro Gly Gly Ala Pro Ser
 595 600 605
 Thr Ser Glu Glu Val Leu Glu Glu Leu Ala Leu Asp Tyr Pro Leu Pro
 610 615 620
 Lys Val Ile Leu Glu Tyr Arg Gly Leu Ala Lys Leu Lys Ser Thr Tyr
 625 630 635 640
 Thr Asp Lys Leu Pro Leu Met Ile Asn Pro Lys Thr Gly Arg Val His
 645 650 655
 Thr Ser Tyr His Gln Ala Val Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser Thr
 660 665 670
 Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Asn Glu Glu Gly Arg Arg
 675 680 685
 Ile Arg Gln Ala Phe Ile Ala Pro Glu Asp Tyr Val Ile Val Ser Ala
 690 695 700
 Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Ile Met Ala His Leu Ser Arg Asp
 705 710 715 720
 Lys Gly Leu Leu Thr Ala Phe Ala Glu Gly Lys Asp Ile His Arg Ala
 725 730 735
 Thr Ala Ala Glu Val Phe Gly Leu Pro Leu Glu Thr Val Thr Ser Glu
 740 745 750
 Gln Arg Arg Ser Ala Lys Ala Ile Asn Phe Gly Leu Ile Tyr Gly Met
 755 760 765
 Ser Ala Phe Gly Leu Ala Arg Gln Leu Asn Ile Pro Arg Lys Glu Ala
 770 775 780

Gln Lys Tyr Met Asp Leu Tyr Phe Glu Arg Tyr Pro Gly Val Leu Glu
 785 790 795 800

Tyr Met Glu Arg Thr Arg Ala Gln Ala Lys Glu Gln Gly Tyr Val Glu
 805 810 815

Thr Leu Asp Gly Arg Arg Leu Tyr Leu Pro Asp Ile Lys Ser Ser Asn
 820 825 830

Gly Ala Arg Arg Ala Ala Ala Glu Arg Ala Ala Ile Asn Ala Pro Met
 835 840 845

Gln Gly Thr Ala Ala Asp Ile Ile Lys Arg Ala Met Ile Ala Val Asp
 850 855 860

Ala Trp Leu Gln Ala Glu Gln Pro Arg Val Arg Met Ile Met Gln Val
 865 870 875 880

His Asp Glu Leu Val Phe Glu Val His Lys Asp Asp Val Asp Ala Val
 885 890 895

Ala Lys Gln Ile His Gln Leu Met Glu Asn Cys Thr Arg Leu Asp Val
 900 905 910

Pro Leu Leu Val Glu Val Gly Ser Gly Glu Asn Trp Asp Gln Ala His
 915 920 925

<210> 3
 <211> 2499
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp Taq
 Polymerase .

<400> 3

atgaggggga tgctgcccct ctttgagccc aaggggccggg tcctcctgggt ggacggccac 60
 cacctggcct accgcaccc ttccacgcccctg aaggggccctca ccaccagccg gggggagccg 120
 gtgcaggccgg tctacggctt cgccaagago ctccctcaagg ccctcaagga ggacggggac 180
 gcggtgatcg tggtctttga cgccaaggcc ccctcccttcc gccacgaggc ctacgggggg 240
 tacaaggccgg gccggggcccc caccggccggag gactttcccc ggcaactcgc cctcatcaag 300
 gagctgggtgg accttccttggg gctggcgccg ctcgaggtcc cgggctacga ggcggacgac 360
 gtcctggcca gcctggccaa gaaggccggaa aaggagggtt acgagggtccg catccatcacc 420
 gccgacaaag acctttatcca gctcccttcc gaccgcatttcc acgttccctcca ccccgagggg 480
 tacctcatca ccccgccctg gcttggggaa aagtacggcc tgaggcccg ccagtggggcc 540
 gactaccggg ccctgaccgg ggacgagtcc gacaaccttc cccgggtcaa gggcatcgaa 600
 gagaagacgg cgaggaagct tctggaggag tgggggagcc tggaaagccct cctcaagaac 660
 ctggaccggc tgaagccgc catccggag aagatcctgg cccacatggc cgatctgaag 720
 ctctccctggg acctggccaa ggtgcgcacc gacccatggcc tggaggtggc cttccggaaaa 780
 aggccggagc ccgaccggga gaggcttagg gcctttctgg agaggcttgc gtttggcagc 840
 ctccctccacg agttcggcct tctggaaagc cccaaaggccc tggaggaggc cccctggccc 900
 cccgccggaaag gggcccttgc gggcttgc tttcccgca aggagcccat gtggggcgat 960
 cttctggccc tggccgccc cagggggggc cgggtccacc gggcccccga gcctataaaa 1020

gcccctcaggg acctgaagga ggcgcgaaaa cttctcgcca aagacctgag cgttctggcc 1080
 ctgagggaag gccttggcct cccgccccgc gacgacccca tgctcctcgc ctacctcctg 1140
 gacccttcca acaccacccc cgagggggtg gcccggcgct acggcgggga gtggacggag 1200
 gagggcgaaaa agcggccgc ctttcccgag aggcttctcg ccaacctgtg ggggaggctt 1260
 gaggggggagg agaggctcct ttggcttac cgggaggtgg agaggccctt ttcgcgttc 1320
 ctggcccaaca tggaggccac gggggtgccgc ctggacgtgg cctatctcag ggccttgtcc 1380
 ctggaggtgg cggagagat cggccgcctc gaggccgagg tcttccgcct ggcggccac 1440
 cccctcaacc tcaactccccg gggccatcg gaaagggtcc tcttgcacga gctagggttt 1500
 cccgcatcg gcaagacggaa gaagagccggc aagcgttcca ccagcgcgcg cgtcctggag 1560
 gcccctcgcc agggccaccc catcggtggag aagatcctgc agtaccggga gtcacccaag 1620
 ctgaagagca cttacattga ccccttgcgg gacccatcc accccaggac gggccgcctc 1680
 cacaccgcgt tcaacccagac ggcacggcc acggcaggc taagtagctc cgatccaaac 1740
 ctccagaaca tccccgtccg caccggcctt gggcagagga tccggccggc cttcatcgcc 1800
 gaggagggggt ggctattggt ggccttggac tataccaga tagagctcag ggttgcgtggcc 1860
 cacctctccg ggcacggagaa cttatccgg gtcttccagg agggccggga catccacacg 1920
 gagaccggca gtcggatgtt cggcgccccc cgggaggccg tggaccctt gatgcgcgg 1980
 gcccggcaaga ccatcaactt cggggctccctc tacggcatgt cggccacccg cctctcccg 2040
 gagctacccaa tcccttacga ggaggcccgag gccttcatcg agcgttactt tcagagcttc 2100
 cccaagggtgc gggccctggat tgagaagacc ctggaggagg gcaggaggcg ggggtacgtg 2160
 gagaccctct tcggccggcc cgcgtacgt ccagacccatggggccggtaa gaagagcg 2220
 cgggaggccg cggacgcgtat ggccttcaac atgcggctcc agggcaccgc cccgaccc 2280
 atgaagctgg ctatggtgaa gtccttcccc aggcttggagg aaatgggggc cagatgctc 2340
 cttcagggtcc acgacggact ggtccctcgag gcccggccaa agggccggga ggcgtggcc 2400
 cggctggcca aggaggcat ggaggggggt tatccctgg ccgtccctt ggaggtggag 2460
 gtggggatag gggaggactg gtcctccgc aaggagtga 2499

<210> 4

<211> 832

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220> ..

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp Taq Polymerase

<400> 4

Met	Arg	Gly	Met	Leu	Pro	Leu	Phe	Glu	Pro	Lys	Gly	Arg	Val	Leu	Leu
1														10	15

Val	Asp	Gly	His	His	Leu	Ala	Tyr	Arg	Thr	Phe	His	Ala	Leu	Lys	Gly
													20	25	30

Leu	Thr	Thr	Ser	Arg	Gly	Glu	Pro	Val	Gln	Ala	Val	Tyr	Gly	Phe	Ala
													35	40	45

Lys	Ser	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Gly	Asp	Ala	Val	Ile	Val
50													55	60	

Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Arg	His	Glu	Ala	Tyr	Gly	Gly
65													70	75	80

Tyr	Lys	Ala	Gly	Arg	Ala	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Phe	Pro	Arg	Gln	Leu
													85	90	95

Ala	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu
													100	105	110

Val Pro Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Val Leu Ala Ser Leu Ala Lys Lys
 115 120 125

Ala Glu Lys Glu Gly Tyr Glu Val Arg Ile Leu Thr Ala Asp Lys Asp
 130 135 140

Leu Tyr Gln Leu Leu Ser Asp Arg Ile His Val Leu His Pro Glu Gly
 145 150 155 160

Tyr Leu Ile Thr Pro Ala Trp Leu Trp Glu Lys Tyr Gly Leu Arg Pro
 165 170 175

Asp Gln Trp Ala Asp Tyr Arg Ala Leu Thr Gly Asp Glu Ser Asp Asn
 180 185 190

Leu Pro Gly Val Lys Gly Ile Gly Glu Lys Thr Ala Arg Lys Leu Leu
 195 200 205

Glu Glu Trp Gly Ser Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asn Leu Asp Arg Leu
 210 215 220

Lys Pro Ala Ile Arg Glu Lys Ile Leu Ala His Met Asp Asp Leu Lys
 225 230 235 240

Leu Ser Trp Asp Leu Ala Lys Val Arg Thr Asp Leu Pro Leu Glu Val
 245 250 255

Asp Phe Ala Lys Arg Arg Glu Pro Asp Arg Glu Arg Leu Arg Ala Phe
 260 265 270

Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Ser Leu Leu His Glu Phe Gly Leu Leu
 275 280 285

Glu Ser Pro Lys Ala Leu Glu Glu Ala Pro Trp Pro Pro Pro Glu Gly
 290 295 300

Ala Phe Val Gly Phe Val Leu Ser Arg Lys Glu Pro Met Trp Ala Asp
 305 310 315 320

Leu Leu Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Gly Arg Val His Arg Ala Pro
 325 330 335

Glu Pro Tyr Lys Ala Leu Arg Asp Leu Lys Glu Ala Arg Gly Leu Leu
 340 345 350

Ala Lys Asp Leu Ser Val Leu Ala Leu Arg Glu Gly Leu Gly Leu Pro
 355 360 365

Pro Gly Asp Asp Pro Met Leu Leu Ala Tyr Leu Leu Asp Pro Ser Asn
 370 375 380

Thr Thr Pro Glu Gly Val Ala Arg Arg Tyr Gly Gly Glu Trp Thr Glu
 385 390 395 400

Glu Ala Gly Glu Arg Ala Ala Leu Ser Glu Arg Leu Phe Ala Asn Leu
 405 410 415

Trp Gly Arg Leu Glu Gly Glu Glu Arg Leu Leu Trp Leu Tyr Arg Glu

420

425

430

Val Glu Arg Pro Leu Ser Ala Val Leu Ala His Met Glu Ala Thr Gly
 435 440 445

Val Arg Leu Asp Val Ala Tyr Leu Arg Ala Leu Ser Leu Glu Val Ala
 450 455 460

Glu Glu Ile Ala Arg Leu Glu Ala Glu Val Phe Arg Leu Ala Gly His
 465 470 475 480

Pro Phe Asn Leu Asn Ser Arg Asp Gln Leu Glu Arg Val Leu Phe Asp
 485 490 495

Glu Leu Gly Leu Pro Ala Ile Gly Lys Thr Glu Lys Thr Gly Lys Arg
 500 505 510

Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Glu Ala Leu Arg Glu Ala His Pro Ile
 515 520 525

Val Glu Lys Ile Leu Gln Tyr Arg Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Thr
 530 535 540

Tyr Ile Asp Pro Leu Pro Asp Leu Ile His Pro Arg Thr Gly Arg Leu
 545 550 555 560

His Thr Arg Phe Asn Gln Thr Ala Thr Ala Thr Gly Arg Leu Ser Ser
 565 570 575

Ser Asp Pro Asn Leu Gln Asn Ile Pro Val Arg Thr Pro Leu Gly Gln
 580 585 590

Arg Ile Arg Arg Ala Phe Ile Ala Glu Glu Gly Trp Leu Leu Val Ala
 595 600 605

Leu Asp Tyr Ser Gln Ile Glu Leu Arg Val Leu Ala His Leu Ser Gly
 610 615 620

Asp Glu Asn Leu Ile Arg Val Phe Gln Glu Gly Arg Asp Ile His Thr
 625 630 635 640

Glu Thr Ala Ser Trp Met Phe Gly Val Pro Arg Glu Ala Val Asp Pro
 645 650 655

Leu Met Arg Arg Ala Ala Lys Thr Ile Asn Phe Gly Val Leu Tyr Gly
 660 665 670

Met Ser Ala His Arg Leu Ser Gln Glu Leu Ala Ile Pro Tyr Glu Glu
 675 680 685

Ala Gln Ala Phe Ile Glu Arg Tyr Phe Gln Ser Phe Pro Lys Val Arg
 690 695 700

Ala Trp Ile Glu Lys Thr Leu Glu Glu Gly Arg Arg Arg Gly Tyr Val
 705 710 715 720

Glu Thr Leu Phe Gly Arg Arg Tyr Val Pro Asp Leu Glu Ala Arg
 725 730 735

Val Lys Ser Val Arg Glu Ala Ala Glu Arg Met Ala Phe Asn Met Pro
 740 745 750
 Val Gln Gly Thr Ala Ala Asp Leu Met Lys Leu Ala Met Val Lys Leu
 755 760 765
 Phe Pro Arg Leu Glu Glu Met Gly Ala Arg Met Leu Leu Gln Val His
 770 775 780
 Asp Glu Leu Val Leu Glu Ala Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ala Val Ala
 785 790 795 800
 Arg Leu Ala Lys Glu Val Met Glu Gly Val Tyr Pro Leu Ala Val Pro
 805 810 815
 Leu Glu Val Glu Val Gly Ile Gly Glu Asp Trp Leu Ser Ala Lys Glu
 820 825 830

<210> 5
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <400> 5
 gtacgtatga tcatgnnnnn nnningatgaa ctggattt

39

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Downstream-Primer

<400> 6
 gctaattaag cttggctgca ggc

23

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Antisense-Primer

<400> 7

tacatggacc tttacttcga acgc

24

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
FVL20TH

<400> 8

acaaaatacc tgtattcctt

20

<210> 9

<211> 90

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
TFVL90A

<400> 9

gacatcatga gagacatcgctctgggcta ataggactac ttctaatctg taagagcaga 60
tccctggaca ggcaaggaaat acaggtattt 90

<210> 10

<211> 90

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize
TFVL90G

<400> 10

gacatcatga gagacatcgctctgggcta ataggactac ttctaatctg taagagcaga 60
tccctggaca ggcgaggaat acaggtattt 90

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
Detektion des SNPs in der humanen genomische
Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz

<400> 11

acaaaatacc tgtattcctn

20

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize der
 humanen genomischen Factor-V-Leiden-DNA-Sequenz;
 n=g, Wildtypmatrize; n=a, mutante Matrize

 <400> 12
 gatccctgga caggcnagga atacaggtat tttgt 35

 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
 Detektion der humanen somatische
 BRAF-T1796A-Mutation

 <400> 13
 gaccgcactcc atcgagattt ct 22

 <210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Wildtyp
 Matrize des BRAF Gens; w= t, Wildtypmatrize; w =
 a, mutante Matrize

 <400> 14
 ggtagctc cagwgaaatc tcgatggagt gggtc 35

 <210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer zur
 Detektion der humanen
 Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPyD) Mutation
 G735A

 <400> 15
 gtttttagatg tttaaatcaca cttat 25

 <210> 16



<211> 38
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize des humanen DPyD; r = g, Wildtypmatrize; r = a, mutante Matrize

<400> 16

ctttccagac aacrtaagtg tgatttaaca tctaaaac

38.

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primär zur Detektion der humanen sauren Ceramidase Mutation A107G

<400> 17

cgttggtcct gaaggaggat

20

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Matrize der humanen sauren Ceramidase; r = a, Wildtypmatrize; r = g, mutante Matrize

<400> 18

aaatcaaacct rtccctccttc aggacccaacg tac

33

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primersonde Braft

<400> 19

gaccactcc atcgagattt ct

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: umgekehrter
Primer für BRAF

<400> 20

agaggaaaga tgaagtacta tg

22

<210> 21

<211> 239

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Zielmatrize
BrafX; w = a, Braf A (Wildtyp); w = t, BrafT
(Mutante)

<400> 21

caactgttca aactgatggg acccactccä tcgagatttc wctgttagcta gaccaaaaatc 60
 acctatttttt actgtgaggt cttcatgaag aaatataatct gaggtgtagt aagtaaagga 120
 aaacagtaga tctcattttc ctatcagagc aagcattatag aagagtttag gtaagagatc 180
 taatttctat aattctgtaa tataatattc tttaaaaacat agtacttcat ctttcctct 239

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primersonde
DpyDT

<400> 22

gttttagatg tttaaatcaca cttat

25

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: umgekehrter
Primer für DpyDT

<400> 23

aaagctcctt tctgaatatt gag

23

<210> 24

<211> 300

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Zielmatrize
 DpyDX; r = a, DpyDA (Wildtyp); r = t, DpyDT
 (Mutante)

<400> 24

aaaatgtgag aaggcacctc ataaaaatatg tcataatggaa atgagcagat aataaaagatt 60
 atagttttc tttgtcaaaa ggagaactcaa tatcttact ctttcatcat gacattgtga 120
 caaatgtttc cccccagaatc atccggggaa ccacctctgg ccccatgtat ggcctggac 180
 aaagctcctt tctgaatatt gagctcatca gtgagaaaaac ggctgcatat tggtgtcaaa 240
 gtgtcactga actaaaggct gactttccag acaacrttaag tgtgatttaa catctaaaac 300

<210> 25

<211> 7043

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pTTQ18::Taq

<400> 25

gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagtttc gccccgaaga acgttttcca 60
 atgatgagca cttttaagt tctgtatgtt ggcgcggtat tatcccgat tgacgccgg 120
 caagagcaac tcggtcgccc catacactat tctcagaatg acttgggtga gtactcacca 180
 gtcacagaaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 240
 accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag 300
 ctaaccgctt ttttgcacaa catggggat catgtaaactc gccttgatcg ttggaaaccg 360
 gagctgaatg aagccataacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 420
 acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta 480
 atagactgga tggaggcggta taaagtgtca ggaccactc tgctgcggc ccttccggct 540
 ggctgggtta ttgctgataa atctggagcc ggtgagctg ggtctcgccg tattattgca 600
 gcaactggggc cagatggtaa gcccctccgt atcgttagtta tctacacgac ggggagtcag 660
 gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcaact gattaagcat 720
 tgtaactgtt cagaccaagt ttactcatat atacttttaga ttgatttaaa acttcatitt 780
 taatttaaaa ggtatcttagt gaagatcctt ttgtataatc tcatgaccaa aatcccttaa 840
 cgtgagttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga 900
 gatccttttt ttctgcgcgt aatctgtc ttgcaaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg 960
 gtggtttgtt tgccgatca agagctacca actcttttc cgaaggttaac tggcttcagc 1020
 agagcgcaga taccaatac tgccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag 1080
 aactctgttag caccgcctac atacctcgct ctgtatacc tggtaaccgt ggctgctgcc 1140
 agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg 1200
 cagcggcggc gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac 1260
 accgaactga gataacctaca gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaaggggaga 1320
 aaggcggaca ggtatccggta aagcggcagg gtcgaaacag gagagcgcac gaggagctt 1380
 ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcggtt ttcgcacact ctgacttgag 1440
 cgtcgatttt tggatgtc tcgcagggggg cggagctat gaaaaaaacgc cagcaacgcg 1500
 gcctttttac ggttctggc cttttgtctgg cttttgtctc acatgttctt tcctgcgtta 1560
 tccccctgatc tggatgttcc cgttattacc gccttgagt gagctgatac cgctcgccgc 1620
 agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaaagagcg cccaaatacgc 1680
 aaaccgcctc tccccgcgc tggccgatt cattaatgca gaattaaatc tcatgttga 1740
 cagcttatac tggactgcac ggtgcacccaa tgctctggc gtcaggcagc catcggaaagc 1800
 tggatgttcc tggatgttcc cgttattacc gccttgagt gagctgatac cgctcgccgc 1860
 ccgttctggta taatgtttt tggccgacca tcataacgggt tctggcaaat attctgaaat 1920
 gagctgttgc caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 1980
 ttcacacagg aaacagcgtt gattcggggg atgctgcggcc tctttgagcc caaggggccgg 2040
 gtcttcctgg tggacggcca ccacctggcc taccgcaccc tccacgcctt gaaaggccctc 2100
 accaccagcc ggggggagcc ggtgcaggcg gtctacggct tcgccaagag cctcctcaag 2160
 gccctcaagg aggacgggga cgcggtgatc gtggctttt acgccaaggg cccctcccttc 2220

cgccacgagg cctacgggggt gtacaaggcg ggccggggccc ccacgcccga ggactttccc 2280
 cgcaactcg ccctcatcaa ggagctgggt gacctctgg ggctggcg cgctcaggatc 2340
 cccggctacg aggcgacga cgtctggcc agcctggcca agaaggcgga aaaggagggc 2400
 tacgaggtcc gcatttcac cccgcacaaa gaccttacc agctccttc cgaccgcata 2460
 cacgtctcc acccccgggggt gtacctcatc accccggct ggcttggga aaagtacggc 2520
 ctgaggcccc accagtgggc cgactaccgg gcccgtaccg gggacgatc cgacaaacctt 2580
 cccggggtaa agggcatcg ggagaagacg gcgaggaagc ttctggagga gtgggggagc 2640
 ctggaaagccc tcctcaagaa cctggaccgg ctgaagccc ccattccggga gaagatctg 2700
 gcccacatgg acgatctgaa gcttcctgg gacctggcca aggtgcgcac cgacactgccc 2760
 ctggaggtgg acttcgccaa aaggcgggag cccgaccggg agaggcttag ggcctttctg 2820
 gagaggcttg agtttggcag cttctccac gagtctggcc ttctggaaag ccccaaggcc 2880
 ctggaggagg cccctggcc cccgcggaa ggggccttcg tgggctttgt gctttccgc 2940
 aaggagccca tggggccga tcttcggcc ctggccggc ccaggggggg ccgggtccac 3000
 cggggccccc agccttataa agccctcagg gacctgaagg aggccgggg gcttctgccc 3060
 aaagacctga gcttctggc cttggggaa ggccttggcc tccgcggcc cgacgacccc 3120
 atgctctcg cttaccccttcc gaccccttcc aacaccaccc cggagggggt ggcccgccgc 3180
 tacgggggg agtggacgga ggaggcgggg gagcgggccc cccttccga gaggcttcc 3240
 gcaacctgt ggggaggat tgagggggag gagaggctcc ttggcttta ccgggaggtg 3300
 gagaggcccc ttccgtgt cttggcccac atggaggcca cgggggtgcg cttggacgtg 3360
 gcttatctca gggcttgc cttggagggt gcccggaga tcgcccgcg cggggccgag 3420
 gtcttcgcgc tggccggcc ccccttcaac ctcaactccc gggaccagct ggaaagggtc 3480
 ctcttgcac agctagggtc tccgcacatc gcaagacgg agaagacccg caagcgtcc 3540
 accacgcggc cgtctggc ggcctccgc gaggcccacc ccattcgga gaagatctg 3600
 cagtacggg agtcaccaa gctgaagacg acctacattt accccttgcg ggacctcatc 3660
 cacccccagga cggccgcct ccacacccgc ttcaaccaga cggccacggc caoggccagg 3720
 ctaagtagct ccgatccaa cttccagaac atccctgtcc gcaccccgct tggcagagg 3780
 atccggccggg ctttcatcgc cggaggagggt tggcttattgg tggcccttggc ctatagccag 3840
 atagagctca ggggtctggc ccacctcttc ggcgacgaga acctgttgcg ggtcttccag 3900
 gagggggcggg acatccacaa gtagaccggc agctggatgt tcggcgctcc ccgggaggcc 3960
 gtggacccccc ttagtgcgcg gcccggccaa accatcaact tcggggctct ctacggcatg 4020
 tcggccacc gcttctccca gtagcttagcc atcccttacg aggaggccca ggccttcatt 4080
 gagcgtactt ttcagagctt ccccaagggtt cggcccttggc ttgagaagac cctggaggag 4140
 ggcaggaggc ggggtacgt gtagaccgtc ttcggccgc gccgctacgt gccagaccta 4200
 gagggccggg tgaagagcgt gcccggggc gccgagcgc tggccttcaa catgcccgtc 4260
 cagggcaccg cccggaccc catgaagctg gctatggtga agctttcccg caggctggag 4320
 gaaatggggg ccaggatgt ctttcagggtc cacgacgacg tggcccttgcg ggccccaaaa 4380
 gagagggcggg aggccgtggc cccgctggcc aaggaggta tggaggggt gtatccccctg 4440
 gccgtgcccc tggaggtggc ggtggggata ggggaggact ggctctccgc caaggagtga 4500
 tagatccctt agagtgcacc tgcaggatgt caagtttggc actggccgtc gttttacaac 4560
 gtcgtactg ggaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg ctttgcacca catccccctt 4620
 tcgcctactg gcttaatagc gaagaggccc gcacccatcg cccttccca cagttgcgc 4680
 gcttgaatgg cgaatggcgc ctgtatgcgtt attttcttcc tacgcacatcg tgcgttattt 4740
 cacaccgcatt aaattccctt ttttggcggc tgagagaaga ttttccgtt gatacagatt 4800
 aaatcagaac gcaagacgg tctgataaaa cagaatttgc ctggccgcag tagcgcgggt 4860
 gttccacactg accccatgcc gaaactcagaa gtgaaacgc gtagccgcg tggtagtgtg 4920
 gggtctccccc atgcgagatc agggactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggtctcgtc 4980
 gaaagactgg gccttcgtt ttatctgtt tttgtcggtg aacgctctcc tgagttaggac 5040
 aaatccggcc ggagccggatt tgaacgttgc gaaagcaacgg cccggagggt ggccggcagg 5100
 acggccgcera taaactgcac ggcacatcaat taagcagaag gccatccgtg cggatggcc 5160
 ttttgcgtt ctacaaactc ttcctgtcgt catacttaca agccatcccc ccacagatac 5220
 ggtaaaacttag cctcggtttt gcatcaggaa agcaggaaat ttatggtgc ctctcgtac 5280
 aatctgtctt gatgcgcatt agttaagcaca gcccgcacac cgcgtacgc 5340
 gcccgcacgg gcttgcgtc tcccgccatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg 5400
 gagctgcatt tgcgttgggt tttcaccgtc atcaccggaa cgcgcgagac gaaaggccct 5460
 cgtatacgc ctatttttt aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtgagg 5520
 ttctgttacc gacaccatcg aatggtgcac aacccttgcg ggtatggcat gatacgcccc 5580
 ggaagagatc caattcaggg tggtaatgt gaaaccagta acgttatacg atgtcgcaga 5640
 gtatggccgt gtcttttac agaccgttcc cgcgtgggt aaccaggccca gccacgtttc 5700

tgcgaaaacg	cggaaaaaaag	tggaaagcggc	gatggcggag	ctgaattaca	ttcccaaccg	5760
cgtggcacaa	caactggcg	gcaaacagtc	gttgcgtatt	ggcgttgcca	cctccagtct	5820
ggcccgtcac	gccccgtcgc	aaatttgcgc	ggcgattaaa	tctcgcgccg	atcaactggg	5880
tgccagcgtg	gtgggtgtcg	tggtagaacg	aagcggcgtc	gaaggctgt	aaggccgggt	5940
gcacaatctt	ctcgcgcaac	gcgtcaagtgg	gctgatcatt	aactatccgc	tggatgacca	6000
ggatgccatt	gtctgttggaa	ctgcctgcac	taatgttccg	gcgttatttc	ttgatgtctc	6060
tgaccagaca	cccatcaaca	gtattatttt	ctcccatgaa	gacgtacgc	gactggcggt	6120
ggagcatctg	gtcgcattgg	gtcaccagca	aatcgcgcgt	ttagcgggccc	cattaagtcc	6180
tgtctcgcg	cgtctcggtc	tggctggctg	gcataaaatat	ctcaactcgca	atcaaattca	6240
gccgatagcg	gaacgggaaag	gcfgactggag	tgccatgtcc	ggtttcaac	aaaccatgca	6300
aatgctgaat	gagggcattcg	ttcccaactgc	gatgctgggtt	gccaacgatc	agatggcgct	6360
gggogcaatg	cgcgcattta	ccgagttccgg	gctgcgcgtt	ggtgcggata	tctcggtagt	6420
gggataacgac	gataccgaaag	acagctcatg	ttatatcccg	ccgttaacca	ccatcaaaca	6480
ggatttgcgc	ctgctggggc	aaaccagcgt	ggaccgcctt	ctgcaactct	ctcaggggcca	6540
ggcggtaag	ggcaatcagc	tgttgcgcgt	ctcaactgggt	aaaagaaaaaa	ccaccctggc	6600
gccccatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	tcattaatgc	agctggcaacg	6660
acaggtttcc	cgactggaaa	ggggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgt	agtttagotca	6720
ctcattaggc	accccaggct	ttacacttta	tgcttccgac	ctgcaagaac	ctcacgtcag	6780
gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgggaa	cccttatttt	tttatttttc	taaatacatt	6840
caaataatgt	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	6900
ggaagagttat	gagtattcaa	cattttcg	tcgcccattat	tcccttttt	gcggcatttt	6960
gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	ttgtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	7020
tggtgcacg	agtgggttac	atc				7043

<210> 26
<211> 10534

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: pQE30

<400>.26

ctacgtctac agtggAACGT caacgtAGAC ttttACACCG gcCTAGACGT ttttGTGTTT 1500
 gggCCGTTGA acgtOTTcGA gaatATCGA atGCCGCTGG tgCCGGTGT tcACGCATT 1560
 gacACGTaaCG gtGTGCCGG caACTTGCAg aAGCtCTTA AGCTTACGG CGACCACGGC 1620
 cacGAAAGTG cgTAACtTGc ATTGCCACAC aAGATCGATC CGAAAGTGT GCACAATCAT 1680
 tCTGAAGAGC tcACCCtTGc TCTGGCTGAG CTGGAAAAGA aAGCgttcta GCTAGGCTTT 1740
 cacGACGTGT tagTAAGACT TCTCGAGTGG GAAGCAGACc GACTCGACCT ttttCTTCGc 1800
 catGAAATTG cAGGTGAGGA ATTTAACCTT tCTTCCACCA AGCAGTTACA aACCATTCTC 1860
 tttGAAAAC aggGCgtGT ttaACgtcA CTCCTTAAAT tGGAAGAAAG GTGGTTCGTC 1920
 aATGTTTGGT aAGAGAAACT ttttGTCCTG ATTAACCGC tGAAGAAAAC GCGGGGTGGC 1980
 gCgCCGTCAA CGTCGGAAGA gGTACTGGAA GAACTGGCGC TGGACTAATT TGGCGACTTC 2040
 tttTGCGGCC cACCgCgCgg cAGTtGcAGC CTTCTCCATG ACCTTCTTGA CCGCGACCTG 2100
 tATCCGTTGC cAAAGTGT tCTGGAGGT CgtGGTCTGG CGAAGCTGA ATCGACCTAC 2160
 accCGACAAGC tGCCGATAGG CAACCGTTT CACTAAGACc TCA TAGCACC AGACCCTTC 2220
 gACTTTAGCT ggATGTTGGT GTTCGACGGC CTGATGATCA ACCCGAAAC CGGGCGTGTG 2280
 cATAACtCTt ATCACCAAGGc AGTAACtGCA ACGGACGTT TATCGGACTA CTAGTGGGC 2340
 ttttGGCCCG cacACGTATG gAGAATAGTg GTCCGTCATT gACGCTGAACG AAGAAGGTG TGTATCCGc 2400
 tCAACCGATC tAAACtGCA AAACATTCCG GTGCGTAACG aAGAAGGTG TGTATCCGc 2460
 cAGGCGTTA ttGCGAGTTG GCTAGGATG GACGTTTGT aAGGCCACGc ATTGTTCTT 2520
 ccAGCAGCAT aggCGTCCG cAAATAACGc CCAGAGGATT ATGTGATTGT CTCAGCGGAC 2580
 tactCGCAGA ttGAACtGCG CATTATGGCG CATOTTTGcG GTGACGGTCT CCTAATACAC 2640
 taACAGAGTC GCCTGATGAG CGTCTAACTT GACGCGTAAT ACCCGTGTAGA AAGCGCACTG 2700
 aaAGGCTTGC tGACCGATT CGCggGAAGGA AAAGATATCC ACCGGGCAAC GGCggCAGAA 2760
 gtGTTTGGT tGCCATTCC GAACGACTGG CGTAAGCGCC ttCCCTTTCT ATAGGTGGCC 2820
 CGTTGCCGCC GTCTTACAA ACCAAACGGT CTGGAAACCG TCACCAGCGA GCAACGCCGT 2880
 agCGCgAAAG CGATCAACTT TGGTCTGATT TATGGCATGA GTGCTGACCT TTGGCAGTGG 2940
 tCGCTCGTT CGGcatCGCG CTTTGTCTAG ttGAAACCAG ACTAAATACC GTACTCACGA 3000
 tTCGGTCTGG CGGGCAATT GAACATTCCA CGTAAAGAAg CGCAGAAgTA CATGGACCTT 3060
 tactTCGAAC GCTACAAAGCC AGACCGCGCC GTTAACtTGT AAGGTGCAATT TCTTCGTC 3120
 tTCATGTACt tGGAATGAA GCTTGCATG CCTGGCTGC TGGAGTATAT GGAACGCAcc 3180
 CGTGTCTAGG CGAAAGAGCA GGGCTACGTT GAAACGCTGG ACGGAGGACC GCAACGACCTC 3240
 atATAACCTT CGTGGCacG AGTCCGCTT CTCGTCCCAGA TGCAACTTTG CGACCTGCT 3300
 CGCGTCTGT ATCTGCCGA TATCAAATEC AGCAATGGTG CTGTCGTGc AGCGGCTGAA 3360
 CGTGCAGCCA tTAACCGGCC AGACATAGAC GGCCTATAGT TTAGGTCTT ACCACGAGCA 3420
 GCAACGTGCCC GACTTGCACG TCGGTAAATTG GCGCCAATGC AGGGAACCGC CGCCGACATT 3480
 atCAAACCGG CGATGATTGc CGTTGATGCG TGGTACAGG CTGAGCGCgg TTACGTCCCT 3540
 tGGCGGCCGG tGTAATAGTT TGCCCGCTAC TAACGGCAAC TACGCAACCA TGTCCGACTC 3600
 caACCGCTG TacGTATGAT CATGCAGGTA CACGATGAAC TGGTATTGTA AGTTCTAA 3660
 gATGATGTTG ATGCCGTTGG CGCACATGCA TACTAGTACG TCCATGTGCT ACTGACCAT 3720
 aaACTTCAAG TATTTCTACT ACAACTACGG GTCYOGAAGC AGATTCTAC ACTGATGGAA 3780
 aACTGTACCC GtCTGGATGT GCGTTGCTG GTGGAAGTGG GGAGTCAGCG CTTCGTCTAA 3840
 gTAGTTGACT ACCTTTGAC ATGGGCAAGAC CTACACGGCA ACGACCACT TCACCCCTCA 3900
 gGCgAAAAct GGGATCAGGC GCACTAAGAT TCGCCTGCG AGCAAGCTTAA TTAGCTGAGC 3960
 ttGGACTCCT GTTgACCGCT tttGACCTA GTCCGCGTGA ttCTAAGCGG ACgtCGGTc 4020
 gAAATTATCG ACTCGAACCT GAGGACAACt TAGATCCAGT AATGACCTCA GAACTCCATC 4080
 tGATTtGTT cagaACGCTC GTTGGCCGCC GGGCGTTTT TATTGATCTA GGTCTATTACT 4140
 ggAGTCTGtA gGTAGACCTA ACAAGTCTT GCGAGCCAAC GGCggCCCGC AAAAATAAC 4200
 gTGAGAATCC AAGCTAGCTT GGCAGAGATT TCAAGGACTA AGGAAGCTAA AATGGAGAAA 4260
 aaaATCACTG GATATCACTC TTAGGTTGCA TCGAACCGCT CTAAGTCC TCGATTCCTT 4320
 CGATTTTACt tCTTTTTA GTGACCTATA ACCACCGTT ATATATCCCA ATGGCATCGT 4380
 aaAGAAACATT ttGAGGCAATT TCACTGAGTT GCTCAATGTA CCTATTGGTG GCAACTATAT 4440
 aggGTTACCG TAGCATTCT TGTAAAACtC CGTAAAGTCA GTCAACGAGT TACATGGATA 4500
 aACCAGACCG tTCAGCTGGA TATTACGGC ttttAAAGA CGTAAAGAA AAATAAGCAC 4560
 aAGTTTtATC CGGCCtTGGT CTGGCAAGTC GACCTATAAT GCCGGAAAAA TTTCTGGCAT 4620
 ttCTTTTtAT tCGTGTtCAA AATAGGCCGG TTTATTcaca TTCTTGCCCG CCTGATGAAT 4680
 GCTCATCCGG AATTTCGTAT GCAATGAAA GACGTTGAGC TGGTGAATAA AGTGTAAAGAA 4740
 CGGGCGGACT ACTTACGAGT AGGCCTTAA GCAACCGTT ACTTTCTGCC ACTCGACCAc 4800
 ATATGGGATA GTGTTCACCC TTGTTACACC GTTTCCATG AGCAAACtGA AACGTTTCA 4860
 TCGCTCTGGA GTGAATATAC CCTATCACAA GTGGGAACAA TGTGGCAAA GGTACTCGTT 4920

tgactttgca aaagttagcga gacctcacatt taccacgacg atttccggca gtttctacac 4980
 atatatccgc aagatgtggc gtgttacggt gaaaacctgg cctatatggc gctgctaaag 5040
 gccgtcaaaag atgttatata aagcgttcta caccgcacaa tgccactttt ggaccggata 5100
 ttcccctaaag gtttatttga gaatatgttt ttcgtctcag ccaatccctg ggtgagttc 5160
 accagtttg atttaaaggg atttcccaa taactcttat aaaaaaaagca gagtccggta 5220
 gggaccact caaatggtc aaaactaaat aacgtggcca atatggacaa cttcttcgac 5280
 cccgtttca ccatggcaa atattatacg caaggcgaca aggtgttgc cccggttatac 5340
 ctgttgaaga agcggggca aaagtggtac ccgtttataa tatgcgttcc gctgttccac 5400
 ctgatgccgc tggcgattca gtttcatcat gccgtttgtg atggcttcca tgcggcaga 5460
 atgcctaattt aatttagacta cggcgaccgc taagtccaa tagtacggca aacactaccg 5520
 aaggtacagg cgtcttacga attacttaa caacagtact gcgatgatg gcaggcgccc 5580
 gcttaatttt ttttaaggcag ttattggtgc ccttaaacgc ctgggggttgt catgacgcta 5640
 ctcaccgtcc cgccccgcat taaaaaaaaatt ccgtcaataa ccacgggaat ttgcggaccc 5700
 gtaatgactc tctagttga ggcataaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactggc 5760
 ctttcgtttt atctgcatta ctgagagatc gaactccgtt gtttattttt cttccgagt 5820
 cagctttctg acccgaaaag caaaaatagac ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag 5880
 gacaaaatccg ccctctagag ctgcctcgcc cggttccgtg atgacaacaa acagccactt 5940
 gcgagaggac tcatctgtt taggcgggag atctcgacgg agcgcgc当地 gccactactg 6000
 ggtgaaaacc tctgacacat gcaactcccg gagacggtca cagttgtct gtaagcggat 6060
 gccggggagca gacaaccact ttggagact gtgtacgtcg agggcctctg ccagtgtcga 6120
 acagacattt gcctacggcc ctcgtctgtt gcccgtcagg ggcgtcagg 6180
 ggggtgtcgcc ggcgcacat gacccagtcg cgtacgcata gcccgtcagg 6240
 agtcgcccac aaccggccac agcccccggcgt cggtactggg tcaatgcatttgc 6300
 gtgtatactg gcttaactat gcccgtatcg agcagattgt actgagatgt caccatatgc 6360
 ggtgtaaaat accgcacat atgaccgaat tgataacggc tagtctcg 6420
 ctcacgtgtt atacgccaat ctttatggcg acagatgcgt aaggagaaaa taccgcata 6480
 ggcgtcttc cgcttctcg ctcactgact cgctgcgtc ggtcgtgtct acgcatttc 6540
 cttttatggc gtagtcccg agaaggcgaa ggagcgagtg actgagcgac gcgagccagc 6600
 ttcggctcgcc gcgagcggtt tcaatgcact caaaggcggt aatacggtt tccacagaat 6660
 caggggataaa cgcagaagcc gacccgtcgc gccatagtcg agttagttc cggcattatg 6720
 ccaataggtt tcttagtccc ctattgcgtc gaaagaacat gtgagcaaaa ggcagcaaa 6780
 aggccaggaa cctgaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt ccatacttc ttgtacactc 6840
 gttttcccggt cgtttcccg tccttggcat ttttccggcg aatcggttcaacgacc 6900
 ggctccgccc ccctgacgacatcacaat atcgacgctc aagttagggg tggcgaaacc 6960
 cgacaggact ataaaccggc ggggggggac tgctcgtagt gtttttagt gcgagttc 7020
 ttcaccacgc ttgggctgt cctgatattt gataccaggc gtttccccctt ggaagctccc 7080
 tcgtcgctc tcctttcccg accctgcgc ttaccggata cctgtctatg gtccgc当地 7140
 ggggaccttc gagggagcac gcgagaggac aaggctgggaa cggcgaatgg cctatggaca 7200
 ccgcctttct cccttccggc agcgtggcgc tttctcatag ctcacgcgtt aggtatctca 7260
 gtcgggtgtt ggtcggggccg aaagaggaa gcccgtcga cccgaaaga gtcgaaaga 7320
 cgacatccat agatcaagc cacatccacg ttcgtctccaa gctggcgtgt gtgcacgaa 7380
 cccccgttca gcccgtccgc tgcgccttat ccgttaacta tcgtcaagcg aggttcgacc 7440
 cgacacacgt gcttgggggg caagtcggc tggcgacgcg gaataggcca ttgtatagc 7500
 tttagtccaa cccgttaaga cacgacttat cgcacttgc agcagccact ggtaacagga 7560
 tttagcagacg gaggttaactc aggttggggc attctgtgtc gaaatagcgtt gatagcgg 7620
 ggtgaccatt gtcctaatcg ttcgtctccaa atgttagggcg tgcgttgc tgcgttgc 7680
 ggtggcttaa ctacggctac actagaagga cagtattttg tatcttacat ccggccacgat 7740
 gtcgtcaagaa ctttaccacc ggattgtatc cgatgtgtc ttccgtcat aaaccataga 7800
 ggcgtctgcgta gaaggccgtt accttccggaa aaagaggatgg tagtcttgc tccggcaaa 7860
 aaaccaccgc tggtaacgcgac gacgacttcg gtcataatggaa gcccgttccat caaccatcga 7920
 gaacttagggc gtttttttgg tggcgaccat ggggtggttt ttttgggttgc aagcagcaga 7980
 ttacgcgc当地 aaaaaaaaggat tctcaagaat atcccttgc ttttcgcca caaaaaaaaac 8040
 aaacgttgcg cgtctaatgc ggcgttccat ttcccttagat tcttcttagga aactagaaaa 8100
 ctacggggc tgcgttccat tggaaacgaaa actcacgtt agggattttg gtcgttgc 8160
 tatcaaaaaat gatctgtatc cccagactgc gagtcacccctt gcttttgc gcaattccct 8220
 aaaaccagta ctctaatatgt ttttccat ttcacttagat ctttttaat taaaaatgaa 8280
 gttttaaatc aatctaaatgt atatatgtatc aaacttggc tgacaatggg atcttaggaaa 8340
 atttaatttt tacttcaaaa tttagttaga ttccatatac actcatttgc accagactgt 8400

gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatccca 8460
 tagttgcctg actccaaatg gttacgaatt agtcactccg tggatagagt cgctagacag 8520
 ataaaagcaag taggtatcaa oggactgagg ccgtcggtta gataactacg atacgggagg 8580
 gettaccattt tggccccagt gctgcaatga taccgcaga cccacggcag cacatctattt 8640
 gatgctatgc cctcccgaaat ggttagacccgg ggtcacgacg ttactatggc gctctgggtg 8700
 gtcacccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaaggccc gagcgcagaa 8760
 gtggcctgc aacttcgagt ggccgagggtc taaatagtcg ttatggc ggtggccctt 8820
 cccggctcgc gtcttacca ggacgttcaa tatccgcctc catccagatctt attaattgtt 8880
 gccgggaagg tagagtaatg agttcgccag taaatagttt ggcgaatagg cggaggtagg 8940
 tcagataattt aacaacggcc cttcgatctc attcatcaag cggtaattt tcaaacgcgt 9000
 acgttgttgc cattgttaca ggcacgttgg tgtaacgctc gtcgtttgtt atggcttcat 9060
 tcagctccgg ttccctgcaa caacggtaac gatgtccgtt gacccacagt gcgagcagca 9120
 aaccataccg aagtaagtgc aggccaaggg aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca 9180
 ttttgtgcaa aaaagcggtt agctcccttg gtcctccgtt cgttgttgc agttccgctc 9240
 aatgtactag ggggtacaac acgttttttc gccaatcgag gaagccagga ggtagcaac 9300
 tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttt ggcagcaactg cataattctc 9360
 ttactgtcat gccatagtct tcatttcaacc ggcgtcacaa tagtgagttac caataccgtc 9420
 gtgacgtattt aagagaatga cgtacggta cggtaagatg cttttctgtt actgggtgat 9480
 actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtt tgccgacc gagggttgc tctacgaaaa 9540
 gacactgacc actcatgagt tgggttca gacacttccat cacatacgcc gctggctcaa 9600
 gctcttgcgc ggcgtcaata cgggataata ccgcgcaca tagcagaact taaaagtgc 9660
 tcatttcatgg aaaaccgaga acggggccgca gttatggccctt attatggcgc ggtgtatcgt 9720
 ctggaaattt tcacgagtag taacctttt gtttttgc gcgaaaactc tcaaggatct 9780
 taccgcgtttt gggatccagt tcgatgttcc accactcgtc acccacaaga agcccccgtt 9840
 ttggaggttc ttagaaatggc gacaactcta ggtcaagcta cattgggttgc gcacgtgggt 9900
 actgatcttc agcatctttt actttcacca ggtttctgg tgtagcaaaa acaggaaggc 9960
 aaaatgccgc aaaaatgact agaagtcgta gaaaatgaaa gttggcgc gacccactc 10020
 gtttttgc ttccgtttt cggcggtttt agggataataa ggcgacacagg aatgttgc 10080
 tactcatact ttccctttt caatattttt gaagcattt ttaggtccctt tattcccgct 10140
 gtgcctttac aacttatgag tatgagaagg aaaaagttt aataacttcg taaaatagtcc 10200
 gttattgtct catgagcggta tacatattttt aatgtattta gaaaataaa caaatagggg 10260
 ttccgcgcac atttccaata acagagtact cgcctatgtt taaacttaca taaaatcttt 10320
 tatttgttta tccccaaaggc ggcgtttaaaag cccgaaaagt gccacctgac gtcataagaaa 10380
 ccattattat catgacatttta acctataaaa ataggcgat caccgggtt tttcacgggt 10440
 gactgcgat tttttgttta taatagtact gtaattggat atttttatacc gcatagtgc 10500
 ggcctttcg ttttaccccg gaaagcaga agtg 10534

<210> 27
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 Matrizenausschnitt (SEQ ID NO: 14); w = t,
 Wildtyp ; w = a, mutante Matrize

<400> 27
 ctaaagwgac a

11

<210> 28
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Matrizenauschnitt (SEQ ID NO: 16); r = g,
Wildtyp; r = a, Mutante

<400> 28
gtgaatrcaa c

11

<210> 29
<211> 11
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Matrizenauschnitt (SEQ ID NO: 12); r = t,
Wildtyp; r = a, Mutante

<400> 29
taaggaycgg a

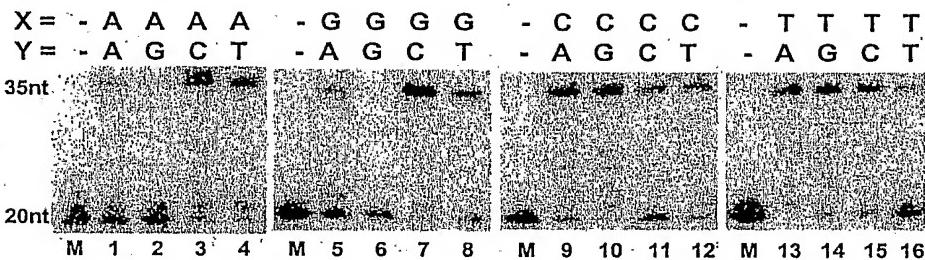
11

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Polymerasen mit einer speziellen Mutation, die eine erhöhte Fehlpaarungs-Diskriminierung aufweisen, deren Herstellung und Verwendung. Die thermostabilen DNA-Polymerasen mit dieser Mutation sind besonders für diagnostische und molekularbiologische Verfahren, z.B. allel-spezifische PCR geeignet.

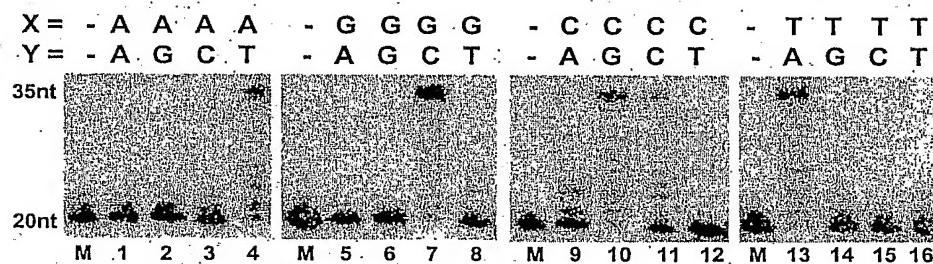
a

Wildtyp (QVH):



b

LVG:



c

LVL:

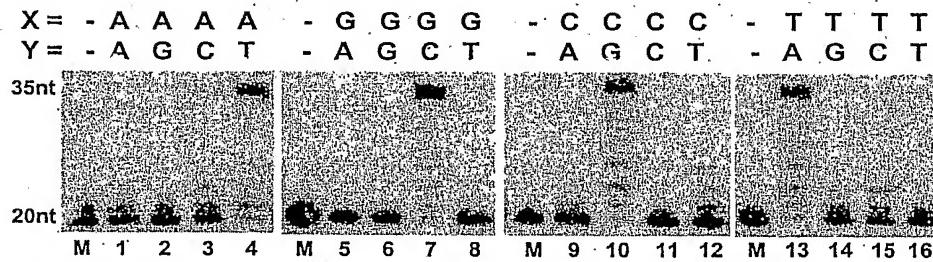


Fig.1

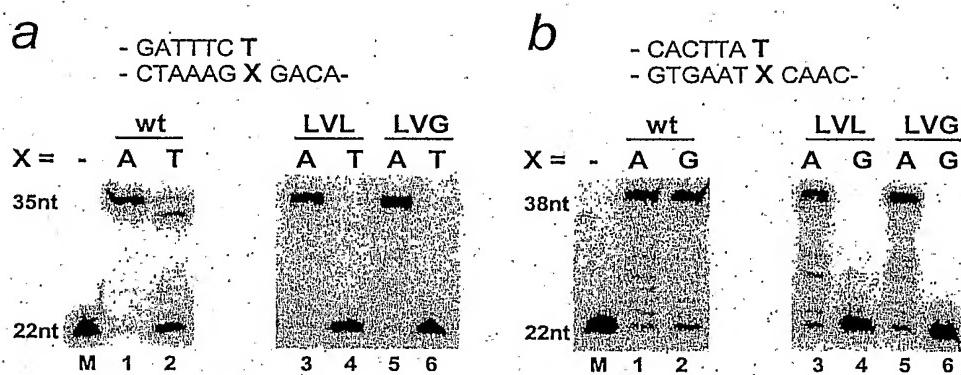


Fig.2

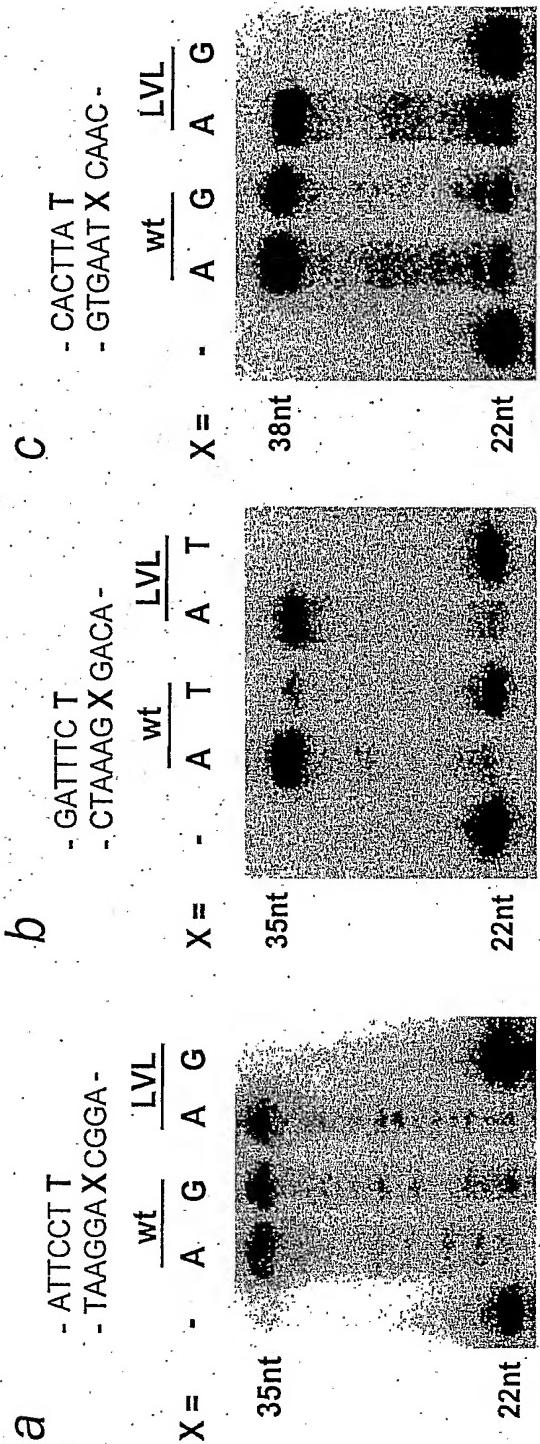


Fig.3

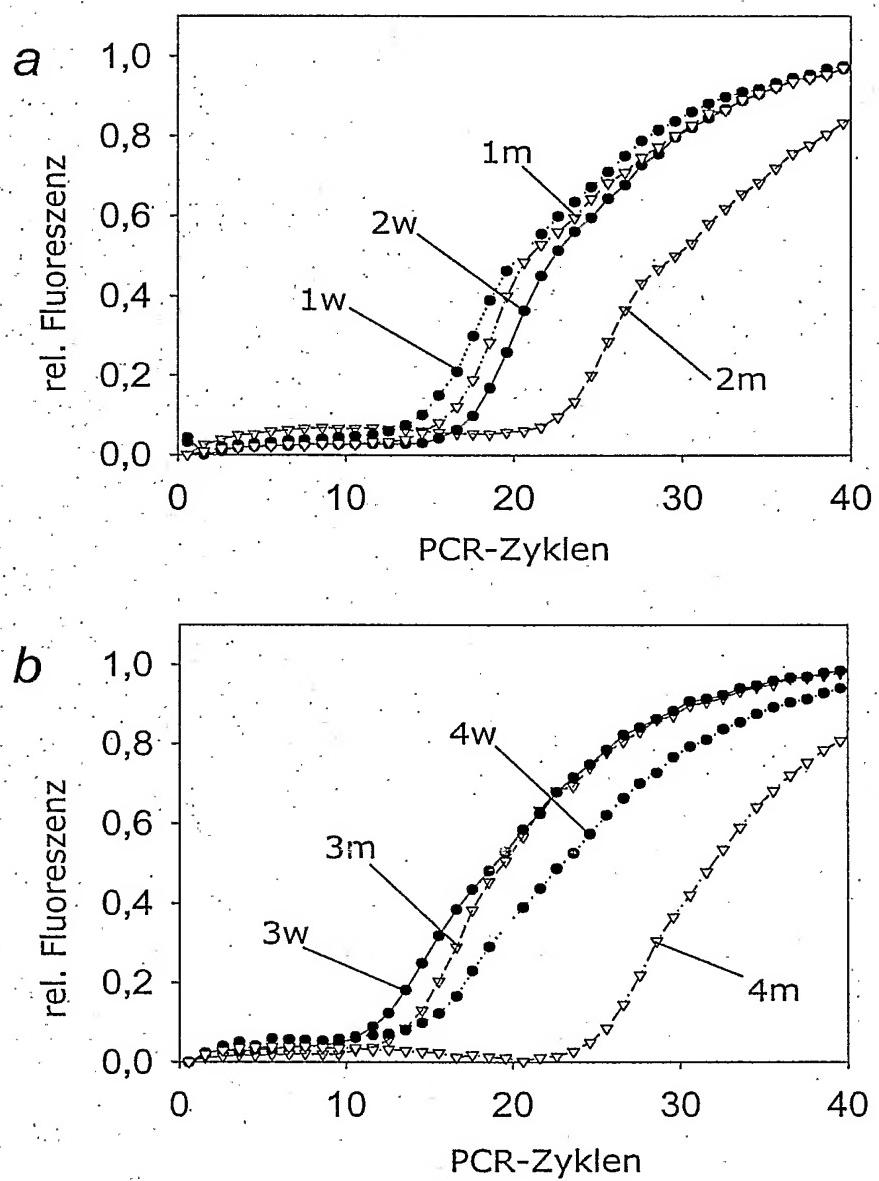


Fig.4